



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**HIDROGELES DE QUITOSANA Y POLIETILENGLICOL A
PARTIR DE LA REACCIÓN DE DIELS–ALDER: ESTUDIO
REOLÓGICO Y PROPIEDADES DE AUTOREPARACIÓN**

Por:

CINTHYA ARACELI RUIZ PARDO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DEL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD Y APROVECHAMIENTO
DE RECURSOS NATURALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Cinthya Araceli Ruiz Pardo la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias.



Dr. Waldo Manuel Argüelles Monal
Director de tesis



Dra. Yolanda Leticia López Franco
Integrante del comité de tesis



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Integrante del comité de tesis



Dr. Carlos Peniche Covas
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Hidrogeles de Quitosana y Polietilenglicol a partir de la Reacción de Diels-Alder: Estudio Reológico y Propiedades de Autoreparación” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Cinthya Araceli Ruiz Pardo, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por la beca brindada para la realización de mis estudios de posgrado.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por permitirme realizar mis estudios doctorales y ser parte esencial en mi formación académica y profesional. Además, por otorgarme la Beca de Terminación de Tesis Doctorado que me fue brindada durante el 2020. De gran relevancia ha sido el respaldo del personal administrativo quienes siempre me apoyaron de la manera más amable durante mis estudios.

A mi director de tesis, el Dr. Waldo Argüelles-Monal por confiar en mí y motivarme, pero sobre todas por sus enseñanzas, que siempre marcarán mi vida profesional y personal.

A mi comité de tesis, el Dr Jaime Lizardi-Mendoza, el Dr. Carlos Peniche-Covas y la Dra. Yolanda López-Franco por su aporte en este proyecto y por contribuir en mi formación científica.

A la M.C. Luisa Silva-Gutiérrez, por tu amistad y ser pieza fundamental para el desarrollo técnico de este proyecto. Por brindar todo tu tiempo y energía durante tiempos tan difíciles.

A la Dra. Maricarmen Recillas Mota porque desde mi llegada al laboratorio siempre tuvo la mejor disposición en apoyarme y en brindarme las mejores palabras para motivarme y animarme.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
1. SINOPSIS	11
1.1. Justificación	11
1.2. Antecedentes.....	13
1.2.1. Quitina y Quitosana	13
1.2.2. Proceso de Obtención	14
1.2.3. Características Fisicoquímicas	15
1.2.3.1. Grado de N-acetilación.....	15
1.2.3.2. Masa Molecular.....	16
1.2.4. Propiedades Funcionales.....	16
1.2.4.1. Solubilidad de la Quitina y Quitosana.....	16
1.2.4.2. Toxicidad, Biocompatibilidad e Inmunogenicidad.....	16
1.2.4.3. Actividad Antimicrobiana.....	17
1.2.5. Ingeniería de Tejidos	17
1.2.6. Polietilenglicol.....	18
1.2.7. Ventajas de un Sistema Compuesto por Quitosana y Polietilenglicol.....	19
1.2.8. Reacción de Diels-Alder	20
1.2.8.1. Antecedentes de la Reacción.....	20
1.2.9. Síntesis de polímeros modificados con derivados de furano	22
1.2.9.1. Polímeros Lineales Entrecruzados con Monómeros Multifuncionales.....	24
1.2.9.2. Redes Macromoleculares a Partir de Polímeros Lineales Funcionalizados con Grupos Laterales de Furano o Maleimida.....	24
1.2.10. Antecedentes de la Síntesis de Quitosana Modificada con Derivados de Furano....	25
1.2.11. Hidrogeles Autoreparables.....	27
1.2.12. Punto de Gelificación.....	29
1.2.13. Efecto de la Temperatura Sobre la Cinética de Reacción	33
1.2.14. Efecto del Solvente en la Cinética de la Reacción de Cicloadición de Diels-Alder	35
1.3. Hipótesis	35
1.4. Objetivo General.....	36
1.5. Objetivos Específicos	36
1.6. Sección Integradora del Trabajo	36

CONTENIDO (continuación)

2. CHITOSAN HYDROGELS BASED ON THE DIELS–ALDER CLICK REACTION: RHEOLOGICAL AND KINETIC STUDY	38
3. DIELS–ALDER CROSSLINKED HYDROGELS: IS RHEOLOGY A SUITABLE METHOD TO STUDY THE SELF-HEALING PROCESS?	60
4. CONCLUSIONES	72
5. REFERENCIAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de la quitosana	14
2. Reacción de Diels-Alder entre furano y maleimida.....	21
3. Secuencia de reacciones para obtener furfural a partir de pentosas (Gandini y Belgacem 2008).....	23
4. Estrategias sintéticas propuestas para la obtención del derivado pre-click de Cs con furano. A) reacción entre los grupos epoxi del furfural glicidil éter y los grupos amino libres del polímero; B) aminación reductiva en un proceso de dos pasos en donde los grupos amino libres de la Cs se unen covalentemente a furfural a temperatura ambiente; C) protección de los grupos amino de la Cs utilizando anhídrido ftálico y posterior reacción con furfural propargil éter mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada con Cu(I).....	27
5. Mecanismo de autoreparabilidad de los hidrogeles obtenidos a partir de la reacción de DA.	29
6. Esquema del crecimiento de los clústeres durante la reticulación. Cuando $p = 0$, solo hay monómero. Con el aumento de la reticulación, p , la conectividad aumenta y los clústeres moleculares (con radio R) van aumentando su tamaño. En estado sólido la red abarca toda la muestra, $2R \rightarrow H$ (Tomado de: Winter y Mours 1997).....	30
7. Esquema de la divergencia de la viscosidad de cizalla cero, η_0 , y el módulo de equilibrio, G_e . El punto gel está marcado con p_c (Tomado de: H. Winter y Mours 1997)	31
8. Módulo de relajación del gel en la vecindad del punto crítico de gelificación (Tomado de: H. H. Winter 2002).....	32

RESUMEN

La cicloadición de Diels-Alder es una reacción de química click que se verifica normalmente entre un dieno y un dienófilo, por ejemplo, furano y maleimida por debajo de 100 °C, mientras que a mayores temperaturas puede aparecer la reacción inversa de retro-Diels-Alder. En este trabajo se estudió por reología dinámica la cinética de la reacción y las características de los hidrogeles entrecruzados mediante la reacción de Diels-Alder entre *N*-furfuril quitosana y derivados maleimida del polietilenglicol. La velocidad de reacción se incrementa con la temperatura, pero el módulo elástico de los hidrogeles disminuye. Esto se explica porque ser más rápida la reticulación, los movimientos segmentales de las cadenas se "*congelan*", con lo cual las posibilidades de reacción disminuyen. Es interesante que un aumento del grado de polimerización de los derivados bifuncionales de PEG-maleimida incrementa notablemente la fortaleza del hidrogel. Debido a su notable hidrofilia y a la flexibilidad de estas cadenas, los derivados de PEGs permiten un mayor completamiento de la reacción, al favorecer una mejor difusión de los grupos maleimida en el medio de reacción. Este efecto es más importante a una menor concentración de quitosana, cuyas cadenas son notablemente más rígidas. Por debajo de 70 °C, los hidrogeles ya formados muestran una mejoría en sus propiedades mecánicas, mientras que por encima de esa temperatura hay una disminución del módulo de almacenamiento del hidrogel, lo que sugiere la presencia de la retro-Diels-Alder.

Los materiales poliméricos entrecruzados con enlaces covalentes dinámicos tienen la habilidad de auto-recuperarse ante un daño físico. En reología dinámica, al aplicar una tensión de cizalla mayor al punto de fluencia, se produce la desintegración mecánica del hidrogel, seguido de una recuperación instantánea al cesar esa deformación. Sin embargo, al examinar ese proceso visualmente o mediante microscopía óptica, son necesarios tiempos mucho mayores para completar la auto-reparación. Esto indica que la recuperación instantánea en experimentos reológicos se debe a la ruptura homolítica de las cadenas macromoleculares en los puntos de mayor tensión, lo que conduce a la formación de radicales libres. Al terminar esa tensión, el hidrogel se recupera instantáneamente debido a la recombinación de los radicales libres. Es posible concluir que, contrario a lo que profusamente se informa en la literatura, el uso de la reología dinámica para evaluar la auto-reparación de hidrogeles químicos carece de fundamento y no es apropiada para estudiar este proceso.

Palabras clave: Química *Click*, Reacción de Diels-Alder, Quitosana, PEG-maleimida, furano, reología, autoreparación

ABSTRACT

Diels-Alder cycloaddition is a *click* chemistry reaction that proceeds below 100 °C between a diene and a dienophile, as furan and maleimide, while at higher temperatures the reverse retro-Diels-Alder reaction may occur. In this study, the reaction kinetics and the viscoelastic characteristics of crosslinked hydrogels based on the Diels-Alder reaction between *N*-furfuryl chitosan and maleimide derivatives of polyethylene glycol were studied by dynamic rheology. The reaction rate increases with temperature, but the elastic modulus of the obtained hydrogels decreases. This is because the faster the cross-linking, the faster the segmental mobility of the chains "freeze" thus decreasing the chances of the reaction to proceed. Interestingly, an increase in the degree of polymerization of the bifunctional PEG-maleimide derivatives significantly strengthens the hydrogel. Due to their remarkable hydrophilicity and the flexibility of these chains, PEGs derivatives allow a higher conversion of the reaction by favoring a better diffusion of the maleimide groups in the reaction medium. This effect is more important at a lower concentration of chitosan whose chains are notably stiffer. Below 70 °C, the already formed hydrogels show an improvement in their mechanical properties, while above that temperature there is a decrease in the storage modulus of the hydrogel, suggesting the presence of retro-Diels-Alder.

Crosslinked polymeric materials with dynamic covalent bonds may have the ability to self-heal from a physical damage. In dynamic rheology, upon applying a shear stress greater than the yield point, mechanical disintegration of the hydrogel occurs, followed by instantaneous recovery upon cessation of that deformation. However, when examining this process visually or by optical microscopy, much longer times are required to complete self-healing. This indicates that the instantaneous recovery in rheological experiments is due to the homolytic cleavage of the macromolecular chains at the points of highest stress, leading to the formation of free radicals. Once the stress is over, the hydrogel recovers instantaneously due to the recombination of free radicals. It is possible to conclude that, contrary to what is profusely reported in the literature, the use of dynamic rheology to evaluate the self-healing of chemical hydrogels is unfounded and is not appropriate to study this process.

Keywords: click chemistry; Diels–Alder reaction; chitosan; PEG-maleimide; furan; rheology, self-healing

1. SINOPSIS

1.1. Justificación

Los hidrogeles son redes macromoleculares tridimensionales capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Su alto contenido de agua y consistencia suave es comparable con la del tejido natural. Estas características permiten su utilización en aplicaciones dirigidas al sector biomédico como sistemas de liberación controlada y en la ingeniería de tejidos (Peppas *et al.*, 2000). Los hidrogeles inyectables están atrayendo cada vez más atención dadas las ventajas que estos representan sobre los hidrogeles convencionales. La aplicación de estos consiste en un procedimiento quirúrgico poco invasivo que permite la formación *in situ* del hidrogel, así como, la co-inyección y encapsulación de agentes terapéuticos o células (Sun *et al.*, 2020). Entre las características a considerar para la preparación de hidrogeles esta la viscosidad de la solución, el tiempo de gelificación, la biocompatibilidad y toxicidad de los polímeros empleados. Dentro de los hidrogeles, los hidrogeles termosensibles son ampliamente estudiados. Estos experimentan transiciones sol-gel como respuesta a los cambios de temperatura (Ahmad *et al.*, 2019).

Diferentes autores han preparado hidrogeles termosensibles a partir de derivados de quitosana (Cs), el principal derivado de la quitina. Los hidrogeles basados en Cs son de gran interés para la industria biomédica debido a sus propiedades biológicas (p.ej., no toxicidad, mucoadhesión, biodegradabilidad y biocompatibilidad entre otras), fisicoquímicas y mecánicas. Debido a la presencia de dos grupos reactivos (-OH y -NH₂) en la estructura de la Cs, es posible modificar la estructura del biopolímero a partir de reacciones, como la alquilación (Y. Kurita & Isogai, 2010, 2012), cuaternización (Cheah *et al.*, 2019; Tabriz *et al.*, 2019), copolimerización de injerto (Fernández-Quiroz *et al.*, 2015; Hassan, 2018), carboxilación, entre otros. Estas modificaciones químicas permiten obtener biomateriales con diferentes propiedades adecuadas para aplicaciones biomédicas (Argüelles-Monal *et al.*, 2018). Un enfoque alternativo que prescinde del uso de entrecruzantes tóxicos como los empleados en los métodos clásicos de derivatización de la Cs, es el uso de reacciones de química *click* (QC).

Por definición, las reacciones de QC son reacciones modulares, termodinámicamente favorables y

estéreo-específicas que proceden bajo condiciones suaves y simples, además generan altos rendimientos sin la formación de subproductos (Kolb *et al.*, 2001). Las reacciones de QC incluyen cicloadiciones [3 + 2], particularmente, cicloadiciones 1,3 de azida-alquino, cicloadición de Huisgen (1984) y la reacción de cicloadición [4 + 2] de Diels-Alder (DA) (Diels & Alder, 1928). Bajo esta última ruta sintética, se han obtenido hidrogeles termosensibles, termorreversibles y autoreparables a partir de un dieno (furfural) y un dienófilo (maleimida) lo que conduce a la formación de un aducto aromático a $T \geq 40$ °C, mientras que a $T \geq 110$ °C el equilibrio de la reacción se puede desplazar hacia los reactivos (Gandini, 2013). El intervalo de temperatura en el que la reacción de DA procede, depende de varios factores entre ellos, la estructura del polímero, la densidad de entrecruzamiento, peso molecular del dieno y dienófilo empleados, grado de polimerización, entre otros. Estos factores así como la temperatura a la cual se obtienen los hidrogeles influyen en las propiedades generales de los materiales lo que permite sintetizar polímeros con características altamente modulables (Orozco *et al.*, 2020).

Los sistemas generados a partir de la reacción de cicloadición de DA poseen enlaces covalentes dinámicos que se distinguen por tener la capacidad de romperse y reformarse de manera reversible. Este tipo de enlaces suelen ser estáticos en condiciones ambientales, pero dinámicos frente a estímulos como la temperatura lo que permite que la red fluya, las grietas se “cierren” y así, la red pueda reestablecerse (Aguirresarobe *et al.*, 2021). Como consecuencia, estos sistemas representan una alternativa para prolongar la vida útil de los sistemas poliméricos y para la modificación de polímeros que pueden ser empleados en la preparación de materiales autorreparables con diferentes funcionalidades en estructuras poliméricas lineales y ramificadas (Z. P. Zhang *et al.*, 2018).

No obstante, la modificación pre-click en la estructura de la Cs es necesaria para la introducción de grupos apropiados para la realización de las reacciones de QC (Kritchenkov & Skorik, 2017). Estas modificaciones previas incluyen, por ejemplo, la inserción de grupos funcionales azida o fragmentos de alquinos, fragmentos altamente dipolarófilos y grupos tiol o dobles enlaces (Boger & Weinreb, 2012). Las estrategias sintéticas para la incorporación de grupos furanos antes de la modificación de la Cs por QC son: i) reacción entre los grupos epóxicos del furfural glicidil éter y los grupos amino libres del polímero (García-Astrain *et al.*, 2014; García-Astrain, González, *et al.*, 2016); ii) amidación reductiva en un proceso de dos pasos en donde los grupos amino libres de la Cs se unen covalentemente a furfural a temperatura ambiente (Guaresti *et al.*, 2017, 2018; Montiel-Herrera *et al.*, 2015a), y iii) protección de los grupos amino de la Cs utilizando anhídrido ftálico y posterior

reacción con furfural propargil éter mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada con Cu (I) (Montiel-Herrera *et al.*, 2015b).

1.2. Antecedentes

1.2.1. Quitina y Quitosana

La quitina es el polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Su producción se estima que es de una tonelada anual a nivel mundial (Kostag & El Seoud, 2021). Las principales fuentes de quitina son los exoesqueletos de crustáceos (por ejemplo, cangrejo, camarón y langostas) y las cutículas de insectos, pero también están presentes en el guano de murciélago y la pared celular de hongos y algas verdes (Younes & Rinaudo, 2015).

Los caparazones de los crustáceos están compuestos de proteína (30 a 40%), carbonato de calcio y potasio (30 a 50%) y quitina (20 a 30%), pero estos porcentajes varían según la fuente y especie de la que se aísla la quitina, así como el proceso utilizado para su aislamiento (Kumari *et al.*, 2015). Así mismo, dependiendo de la fuente, se puede encontrar a la quitina en tres formas polimórficas distintas: α -quitina, β -quitina y γ -quitina que corresponden a ordenamientos antiparalelos y paralelos respectivamente. La α -quitina es el polimorfo más estable y abundante. Por lo general, se aísla del exoesqueleto de crustáceos, paredes celulares de levaduras y cutícula de artrópodos. Mientras, que la β -quitina puede extraerse de pluma de calamar y convertirse fácilmente en forma α mediante tratamiento alcalino (Kumirska *et al.*, 2010).

Por otra parte, la quitosana (Cs) es el principal derivado de la quitina, obtenido por desacetilación en condiciones alcalinas. La Cs está compuesta por una cadena lineal de unidades repetidas de β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetil-D-glucosamina y su unidad desacetilada que incluye un grupo acetamida en la posición C-2 de la glucosamina (GlcNH₂), un grupo hidroxilo secundario en C-3 y un grupo hidroxilo primario en C-6 (El Knidri *et al.*, 2018). En la Figura 1 se muestran las estructuras químicas de quitina y Cs.

El peso molecular y el grado de *N*-acetilación entre diferentes muestras de Cs pueden variar según

el método utilizado para su obtención y su fuente (Younes & Rinaudo, 2015). Esas características modulan las propiedades biológicas (p. ej., no toxicidad, mucoadhesión, biodegradabilidad y biocompatibilidad, etc.) fisicoquímicas y mecánicas de la Cs. Por lo tanto, el grado de *N*-acetilación y la masa molecular son los principales parámetros a tener en cuenta en el diseño de materiales basados en Cs como predictor de sus propiedades y aplicaciones potenciales (J. Li *et al.*, 2019).

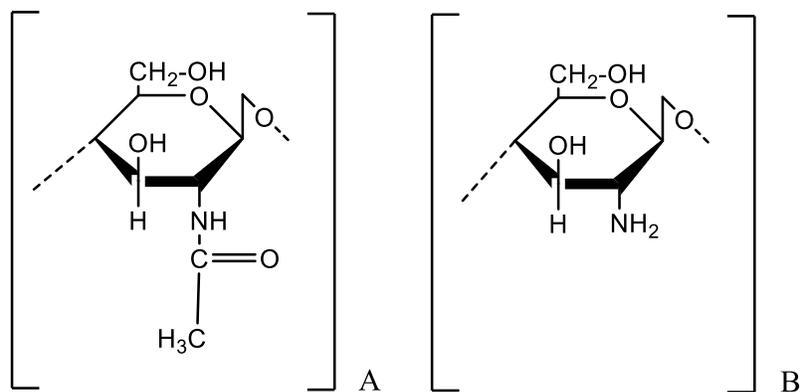


Figura 1. Estructura química de la quitosana

1.2.2. Proceso de Obtención

La extracción de quitina para todas las fuentes biológicas mencionadas comprende un tratamiento químico que consta de: a) desmineralización; b) desproteinización y c) desacetilación. Frecuentemente, se puede agregar un paso, el proceso de decoloración, para eliminar el pigmento de la muestra, principalmente a los β -caroteno, y utilizando diversos tratamientos con hipoclorito de sodio, acetona o peróxido de hidrógeno (Srinivasan *et al.*, 2018). Pero éstos últimos deben evitarse para no degradar la estructura química del polímero.

Dentro de los procesos de desacetilación de quitina reportados pueden distinguirse dos tipos de reacción: las heterogéneas y las homogéneas. En las reacciones de fase heterogénea, las condiciones de la reacción tienen una fuerte influencia en las características del producto final y en consecuencia en sus propiedades funcionales. Eso genera productos finales que tienden a presentar una amplia variabilidad en parámetros como el grado de acetilación y el peso molecular (Younes

et al., 2014). Adicionalmente, éstos se llevan a cabo utilizando altas concentraciones (20-50%) de hidróxido de sodio (NaOH) a temperaturas alrededor de los 100 °C con tiempos de reacción variables (minutos u horas).

Por su parte, la desacetilación en condiciones homogéneas consiste en disolver la quitina en un álcali a concentraciones intermedias mediante congelación y descongelación dando como resultado la formación de soluciones de quitina alcalina. Este método permite obtener Cs con una distribución homogénea de grupos acetamida y grupos amino libres a lo largo de la cadena, lo que favorece su solubilidad. Este tipo de reacciones se realizan a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo y se generan productos aleatoriamente desacetilados (Nemtsev *et al.*, 2002).

También, existen métodos alternativos para la extracción de quitina que se basan en la fermentación microbiana y la utilización de enzimas proteolíticas (tripsina, papaína o pepsina), pero el alto costo de este último, es el principal obstáculo de este proceso (Pakizeh *et al.*, 2021). Por último, la irradiación de microondas es un método emergente para la obtención de la Cs utilizado como alternativa al calentamiento térmico convencional porque ofrece mayores velocidades de reacción, tiempos de reacción más cortos, mayores rendimientos, ahorro de energía y una reducción de las reacciones secundarias (El Knidri *et al.*, 2019).

1.2.3 Características Físicoquímicas

1.2.3.1. Grado de N-acetilación. El grado de acetilación lo podemos definir como la fracción o el porcentaje de unidades glicosídicas *N*-acetiladas en la cadena de la Cs. Entre los factores que pueden afectar el grado de acetilación de la Cs se encuentran la concentración de álcali utilizada, tratamientos previos, tamaño de partícula, cristalinidad y porosidad. La extensión y distribución del grado de acetilación provoca cambios en las propiedades principales de la molécula. Uno de estos cambios es que, los grupos amino se vuelven ionizables lo que permite formar soluciones e interactuar con diversas moléculas. Por lo tanto, el grado de acetilación determina la mayoría de las propiedades de la Cs, incluida la solubilidad, el grado de hinchamiento y sus propiedades funcionales (Lizardi-Mendoza *et al.*, 2016).

1.2.3.2. Masa Molecular. El peso molecular de es una de las principales características de la Cs ya que, influye en sus propiedades funcionales, ya sea en solución o en estado sólido. Además, el peso molecular tiene una influencia particular en las propiedades viscoelásticas de las soluciones y las formas coloidales hidratadas (Lizardi-Mendoza et al., 2016).

1.2.4. Propiedades Funcionales

1.2.4.1. Solubilidad de la Quitina y Quitosana. La quitina es altamente insoluble en solventes generales debido a los numerosos puentes de hidrógeno intercatenarios entre C-O-H que conforman su estructura (El Knidri et al., 2018). Si bien la quitina es insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos, la Cs puede ser fácilmente solubilizada en soluciones ácidas diluidas. Esto se debe a que la Cs puede considerarse una base débil ya que posee grupos amino primarios con un valor de pKa de 6.3. A pH bajo, estas aminas se protonan y se cargan positivamente y eso hace que la Cs sea un polielectrolito catiónico soluble en agua. Por otro lado, a medida que el pH aumenta, los grupos amino de la Cs se desprotonan y el polímero pierde su carga y se vuelve insoluble. La transición soluble-insoluble ocurre en su valor de pKa alrededor de 6 y 6.5. Como el valor de pKa depende en gran medida del grado de N-acetilación, la solubilidad de la Cs depende del grado de N-acetilación y del método de grado de N-acetilación utilizado (Pillai et al., 2009).

1.2.4.2. Toxicidad, Biocompatibilidad e Inmunogenicidad. Además de la no toxicidad y biocompatibilidad, la Cs puede ser degradada in vivo por varias enzimas, principalmente por la lisozima (una glicosidasa presente en todos los tejidos de mamíferos). Los productos de la degradación son oligosacáridos no tóxicos que luego pueden excretarse o incorporarse a glucosaminoglicanos y glucoproteínas. Estas propiedades hacen posible el uso de la Cs en aplicaciones biomédicas (K. Kurita et al., 2000; Muzzarelli, 1993). Además, la Cs puede mejorar la penetración del fármaco al abrir las uniones estrechas entre las células epiteliales. La quitina y la Cs exhiben una buena afinidad por algunas biomoléculas activas como antígenos y citocinas (Jean et al., 2009; Mehrabi et al., 2018; Mirtajaddini et al., 2021).

1.2.4.3. Actividad Antimicrobiana. Las propiedades antimicrobianas de la Cs dependen de diferentes parámetros. Entre los principales, están el peso molecular y el grado de acetilación. Existen diversos mecanismos por los cuales la Cs actúa como agente antimicrobiano. i) la interacción de los grupos NH_3^+ de la Cs con los grupos cargados negativamente en la superficie de la pared celular bacteriana, que alteran de la permeabilidad de la membrana celular; ii) la Cs se une al ADN e inhibe la síntesis de ARN; iii) la Cs remueve metales esenciales para el desarrollo microbiano y la producción de toxinas. Se ha probado que la Cs presenta actividad antimicrobiana tanto para bacterias gram-positivas, como gram-negativas. Sin embargo, su actividad biocida es mayor para los organismos gram-positivos debido a que la Cs puede unirse a los ácidos teicoicos de la membrana. En el caso de las bacterias gram-negativas, la Cs altera el lipopolisacárido, lo que conduce a la permeabilización de la membrana externa de la bacteria (Bakshi et al., 2018). Otros parámetros que intervienen en la actividad antimicrobiana de la Cs son pH, solubilidad y temperatura (Moeini et al., 2020).

1.2.5. Ingeniería de Tejidos

La Cs se ha empleado en aplicaciones de ingeniería de tejidos específicamente en la fabricación de materiales aplicables en tejidos como, piel, cartílago, óseo, vertebral, sanguíneo, córneo, y periodontal. En relación con las aplicaciones de ingeniería de tejidos se ha reportado la posibilidad de emplear diversos materiales basados en Cs como fibras, esponjas e hidrogeles a partir de mezclas con otros polímeros naturales o sintéticos (Tao et al., 2020). La Cs interactúa electrostáticamente con los glucosaminoglicanos cargados negativamente de la matriz extracelular, promueve la actividad condrogénica y la expresión de proteínas específicas del cartílago. De esta manera, la Cs estimula la síntesis de los glucosaminoglicanos que promueven la formación del cartílago (Kim et al., 2008).

Del mismo modo, se han desarrollado sustitutos de piel (injertos) y principalmente, andamios a partir de Cs. Estos últimos, deben de actuar de manera análoga a la matriz extracelular, promoviendo la diferenciación y proliferación celular dirigida para la inducción de la reepitelización (Shevchenko et al., 2010). Del mismo modo, se han preparado andamios o

membranas basadas en Cs para su exploración en ingeniería de tejido córneo. Generalmente, el tratamiento para las lesiones de la córnea a menudo es el trasplante de membrana amniótica. Durante este proceso, la susceptibilidad a infección y rechazo por el organismo receptor es alta. Por ello, la Cs es ampliamente elegida por su biocompatibilidad y características antiinflamatorias. Sin embargo, sus andamios o membranas tienen inconvenientes, incluida una resistencia mecánica deficiente (Islam *et al.*, 2020).

1.2.6. Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) es un poliéter diol lineal o ramificado derivado de la polimerización por apertura de anillo de epoxietano (Xiao *et al.*, 2013), que se caracteriza por ser hidrofílico y no iónico además de ser plastificante, biocompatible, no tóxico, no inmunogénico y no inflamatorio (Koosehghol *et al.*, 2017). Por estas razones, la FDA aprueba su uso en preparaciones farmacéuticas y productos de biotecnología inyectables (Ganji & Abdekhodaie, 2008).

Este polímero puede sintetizarse en un gran rango de masas moleculares (0.2 – 10,000 kDa), y funcionalizarse con diferentes grupos terminales (por ejemplo, amino, carboxilo y sulfhidrilo, aldehído, azida, maleimida) (Ganji & Abdekhodaie, 2008). El estado físico de los PEGs varía en función de su masa molecular y pueden encontrarse PEGs líquidos en los rangos de masa molecular de 0.2-0.6 kDa y sólidos semicristalinos a temperatura ambiente a partir de 1 kDa, lo que permite su aplicabilidad en diversas formas de dosificación que van desde vehículos para administración oral, soluciones parenterales y encapsulación para liberación controlada (Gullapalli & Mazzitelli, 2015).

Los PEG son altamente solubles en agua, así como en la mayoría de los solventes, incluidos metanol y diclorometano. Al mismo tiempo, hay evidencia de que estos pueden aumentar la hidrofiliidad de compuestos poco solubles en agua. Estas características de los PEG se atribuyen a sus grupos hidroxilo terminales y éter. Por ejemplo, Zhu *et al.* (2018) prepararon andamios auto ensamblables e inyectables a partir de un copolímero anfifílico con forma de estrella basado en PEG y sulfuro de propileno que demostró solubilizar un agente hidrofóbico promotor de la regeneración y reparación de tejido en dosis terapéuticas. Por otro lado, Lu *et al.* (2019)

desarrollaron nanovehículos basados en PEG entrecruzado con polietilenimina-*g*-poli(ϵ -benciloxycarbonil-L-lisina) cargados con curcumina. Los resultados indican que la estabilidad termodinámica de las micelas que contenían curcumina aumentó, así como la capacidad de carga del vehículo y la apoptosis en la línea celular HepG2 en comparación con el control (Lu *et al.*, 2019).

Adicionalmente, los fármacos producidos a partir de polímeros derivatizados con PEG han mostrado mejoras en sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, como son i) prolongación de la residencia corporal; ii) mejora de la solubilidad en agua; iii) eliminación renal reducida y toxicidad limitada; iv) mayor estabilidad a la degradación enzimática (por proteasas o nucleasas) y vi) reducción de inmunogenicidad (Casettari *et al.*, 2010).

1.2.7. Ventajas de un Sistema Compuesto por Quitosana y Polietilenglicol

El problema más importante asociado con el uso de la Cs es que ésta presenta solubilidad limitada a valores de pH \sim 5.5–6.5 (Casettari *et al.*, 2012). Al ser una base débil, la Cs solo se solubiliza bajo condiciones ácidas en soluciones de ácidos acuosos diluidos tal como, el ácido clorhídrico y ácidos acuosos orgánicos tales como, los ácidos fórmico, acético, oxálico y láctico (Lizardi-Mendoza *et al.*, 2016). En este sentido, se han empleado distintos métodos de derivatización para la mejora de la solubilidad de Cs. Entre estos métodos se encuentran sulfonación, cuaternización, carboximetilación, *N*- y *O*-hidroxi alquilación y PEGilación, además de una variedad de copolimerizaciones por injerto de Cs (Casettari *et al.*, 2010).

La PEGilación de Cs ha demostrado la ventaja de generar productos altamente solubles (pH de 1.0 a 11.0) (Casettari *et al.*, 2012). Además, existe evidencia de que estos materiales también mejoran la biocompatibilidad y biodisponibilidad *in vivo* de fármacos y degradabilidad por la lisozima, influenciada por el contenido y la masa molecular del PEG Jing *et al.* (2017) prepararon derivados de Cs-PEG reticulados covalentemente vía amidación reductiva para la administración de fármacos proteínicos (albúmina de suero bovino, BSA). Se evaluó la liberación acumulada de BSA bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, siendo baja a las 2 horas y mostrando un incremento a las 12 horas por efecto de la enzima intestinal lisozima (Peppas *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha mostrado que la introducción de la cadena de PEG en el esqueleto de la Cs reduce la citotoxicidad de la molécula. La introducción de PEG a la cadena polimérica de Cs se ha asociado con un aumento en la viabilidad de la línea celular HeLa y A549 evaluada por el método de MTT. Se ha señalado una relación clara entre el grado de sustitución de Cs con PEG y la viabilidad de la línea celular Calu-3 y que su viabilidad disminuye al aumentar la masa molecular de PEG y el grado de acetilación de la Cs (Casettari *et al.*, 2010).

Además, se han preparado materiales nanoestructurados a partir de Cs injertada con PEG para su aplicación como vehículo para la administración de fármacos. Los métodos que se han reportado para obtener Cs-g-PEG son autoagregación, acomplejamiento, gelificación iónica, y evaporación del disolvente (Savin *et al.*, 2019). Ouchi, Nishizawa, y Ohya (1998) prepararon un copolímero de quitosana injertado con un derivado de PEG que en soluciones acuosas mostró la formación espontánea de agregados (< 120 nm) debido a la presencia de puentes de hidrógeno intermoleculares en la estructura del material (Tanuma *et al.*, 2010). Otro estudio realizado por Jing *et al.* (2017) muestra la capacidad de este copolímero para formar agregados (300 nm) con una eficiencia de carga que depende del grado de sustitución de la Cs. Por otro lado, Bae *et al.* (2009) han sintetizado un copolímero de la CS injertado con un derivado de PEG que forma un complejo polielectrolito con heparina autoensamblable que promueve la inducción de apoptosis en células cancerosas (B16F100). Savin *et al.* (2019) desarrollaron un copolímero de Cs-g-poli(etilenglicol) que se usó para preparar nanopartículas (> 300 nm) por el método de gelificación iónica usando tripolifosfato de sodio (TPP) como agente entrecruzante. Las nanopartículas se cargaron con insulina y presentaron una eficiencia de carga del 38%.

1.2.8. Reacción de Diels-Alder

1.2.8.1. Antecedentes de la Reacción. La reacción de cicloadición [4+2] fue descrita por primera vez por Otto Diels y Kirk Alder en 1928. Ambos recibieron el premio Nobel de Química en 1950 por sus investigaciones en este campo (The Nobel Prize in Chemistry, 1950). Esta famosa reacción, que se conoce con el nombre de Diels-Alder (DA), es una cicloadición [4+2] que ocurre entre un dieno (rico en electrones) y un dienófilo (deficiente en electrones). Como consecuencia, se forma

un anillo aromático de 6 carbonos, que puede proceder reversiblemente a temperaturas por encima de los 100 °C como se muestra en la Figura 2 (Gandini, 2013). Heteroátomos tales como O, S, N, P, pueden ser incluidos tanto en el dieno como en el dienófilo generando productos con alta eficiencia y estereoselectividad (Boger & Weinreb, 2012; Tietze & Ketschau, 1997). En algunos casos se pueden producir aductos bicíclicos (Ding et al., 2014). Por otro lado, en la reacción de DA generalmente se siguen cinéticas de reacción rápidas, con la obtención de productos con altos rendimientos, bajo condiciones suaves de reacción y sin necesidad de emplear catalizadores (Oluwasanmi & Hoskins, 2021).

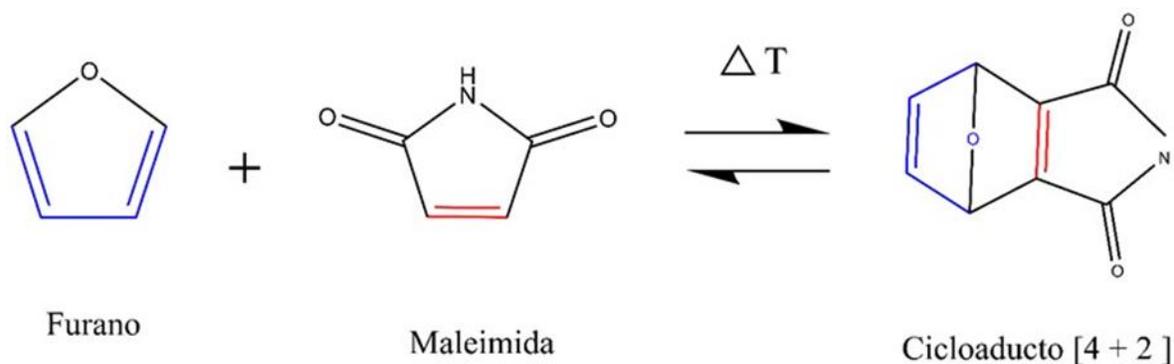


Figura 2. Reacción de Diels-Alder entre furano y maleimida

La reacción de DA es seguida por las reglas de Woodward-Hoffmann como una cicloadición [$\pi 4s + \pi 2s$] que se produce de forma concertada, de manera simétrica o asimétricamente sincrónica. La concertación de un mecanismo está determinada por la topología de la superficie de energía potencial. Un mecanismo concertado se produce cuando el sistema muestra solo un estado de transición entre los reactivos y los productos, de modo que el proceso se lleva a cabo en un solo paso. Un mecanismo será paso a paso (en dos o más pasos elementales) cuando el sistema posea, al menos, dos estados de transición separados por una especie intermediaria previa a la formación de los productos (Tasdelen *et al.*, 2016). De esta manera, se generan productos altamente regioestereo-específicos y de estructuras predecibles en las que se forman dos nuevos enlaces sigma carbono-carbono, con hasta cuatro nuevos centros estereogénicos, formando heterociclos de seis miembros. Esto se puede lograr a través de diferentes estrategias, como el uso de dienos o hetero dienófilos ópticamente activos. Alternativamente, utilizando catalizadores quirales o

auxiliares quirales que pueden proporcionar accesibilidad a los compuestos heterocíclicos quirales de forma similar. La ventaja es que la formación de estos compuestos heterocíclicos quirales puede ser el objetivo de la ruta sintética *per se* o pueden estos ser intermediarios para la formación de compuestos altamente funcionalizados que pueden ser utilizados para la síntesis de moléculas más complejas (Brasca *et al.*, 2009).

Generalmente, la reacción de DA se realiza bajo condiciones específicas, en las que la naturaleza de los reactivos participantes no es iónica, ni altamente polar. De manera que, el papel del solvente puede ser crucial dado que, en combinación con el par de dieno y dienófilo específicos, puede conducir a posibles reacciones secundarias y aumentar la probabilidad de la obtención de derivados con estructuras no predecibles (Dobrowolski *et al.*, 2017). Recientemente, se han propuesto diferentes mecanismos de reacción para los sistemas DA, entre estos mecanismos se encuentran a) escalonado; b) birradical; c) birradical escalonado; d) escalonado de dos etapas y e) zwitteriónico escalonado (Jasiński, 2016a, 2016b, 2017).

1.2.9. Síntesis de polímeros modificados con derivados de furano

Uno de los ejemplos más representativos es entre los grupos furano (diene) y maleimida (dienófilo). La utilización de los compuestos furánicos en la reacción de DA se destaca porque estos son compuestos heterocíclicos que se obtienen a gran escala a partir de desechos agrícolas. Es conocido que el furfural se obtiene a partir de hidrólisis ácida de las pentosas presentes en la hemicelulosa, seguida por deshidratación y ciclización, lo que conduce a la formación de furfural, que es el derivado furánico de primera generación más importante hoy en día (Figura 3) (Gandini *et al.*, 2008; Urdl *et al.*, 2018). Por otra parte, las maleimidias son parte de la familia de los dienófilos y han sido estudiadas por su alta reactividad y amplia variedad estructural debido a la naturaleza de sus sustituyentes de nitrógeno que proveen una variedad de derivados mono y polifuncionales (Gandini, 2005).

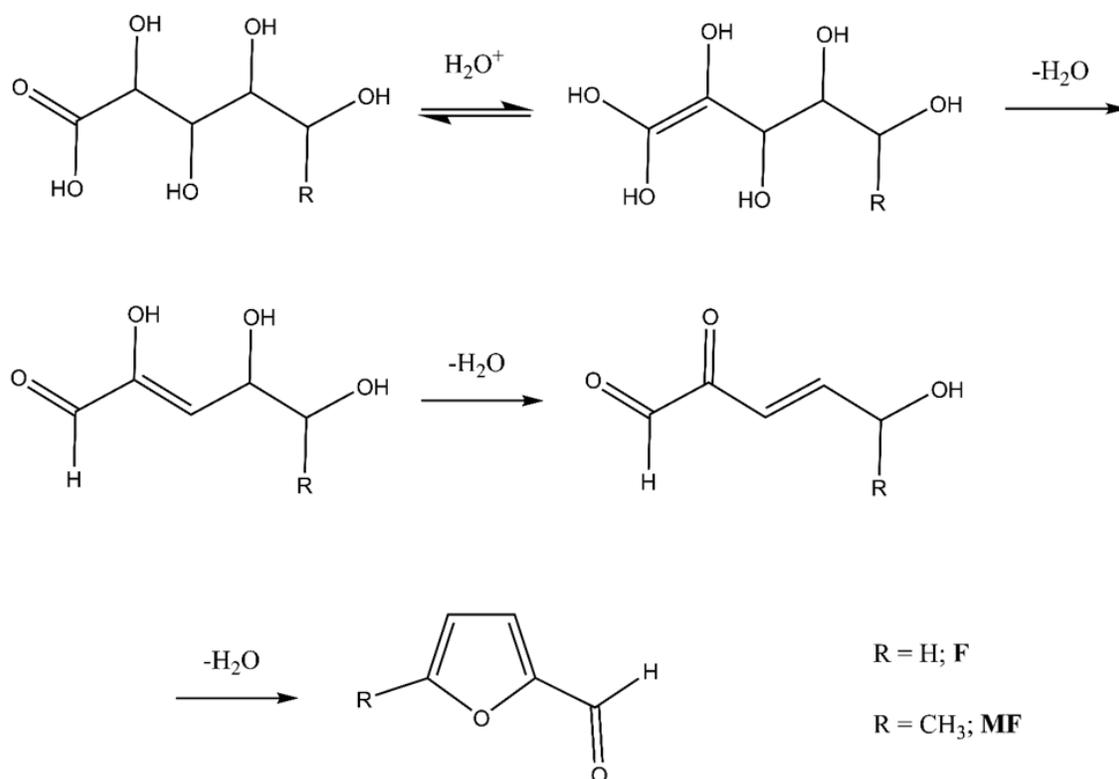


Figura 3. Secuencia de reacciones para obtener furfural a partir de pentosas (Gandini & Belgacem, 2008).

La aplicación de este par de dienos y dienófilos en la síntesis macromolecular ha recibido mucha atención en las últimas décadas. Dos enfoques distintos dominan este campo: (i) la construcción de polímeros lineales o entrecruzados a través de las reacciones de acoplamiento de DA a partir de monómeros complementarios multifuncionales como son los derivados di o tri furánicos y bismaleimidias; y (ii) la formación de redes macromoleculares a partir de polímeros lineales con grupos laterales complementarios de furano o maleimida (Gandini, 2005). Estos polímeros se pueden revertir a sus precursores a través de la reacción de retro Diels-Alder (RDA), característica que puede ser explotada en muchas aplicaciones, por la posibilidad de reciclar o "reparar" sus cadenas (Gandini & Lacerda, 2015).

Como se indica anteriormente, la cicloadición de Diels-Alder tiene la importante peculiaridad de ser térmicamente reversible, es decir, el equilibrio se desplaza fuertemente hacia los reactivos a medida que aumenta la temperatura. Por lo tanto, generalmente es preferible llevar a cabo las cicloadiciones de Diels-Alder a temperaturas moderadas, a menudo con catalizadores de ácido de Lewis. No todas las estructuras furánicas experimentan la reacción de Diels-Alder. El furano y los

furanos sustituidos con grupos alquilo muestran una reactividad pronunciada, excepto cuando los sustituyentes son demasiado voluminosos. Los derivados de furano-carbonilo, como los ácidos furfural y furoico, no reaccionan en la mayoría de las condiciones (Gandini & Belgacem, 1997). En esta sección, se describe cómo la modificación de polímeros a partir de compuestos derivados de furano puede modificar las propiedades iniciales del monómero y posteriormente intervenir en la reacción de Diels-Alder y RDA, utilizando diferentes dienófilos derivados de maleimida mono o bifuncionales.

1.2.9.1. Polímeros Lineales Entrecruzados con Monómeros Multifuncionales. Existe la evidencia de la obtención de materiales hidrofílicos termorreversibles con potencial biomédico a partir de óxido de polietileno modificado con un derivado de furfural y entrecruzado con bismaleimida para generar polímeros con aductos terminales o intercatenarios (Sedaghat et al., 2017). Además, se han preparado sistemas que muestran capacidad de remodelación y termoreversibilidad a partir de estructuras polilácticas ramificadas con múltiples furanos y acopladas a maleimidias multifuncionales mediante DA (Inoue et al., 2009). De manera similar, se sintetizó un copolímero termorreversible entre poli(caprolactona) de 4 brazos funcionalizada con grupos terminales furfurilo y entrecruzado con maleimidabismaleimida aromática para generar redes termorreversibles con un grado de conversión del 99 % (Defize et al., 2011).

1.2.9.2. Redes Macromoleculares a Partir de Polímeros Lineales Funcionalizados con Grupos Laterales de Furano o Maleimida. Se ha reportado la obtención de hidrogeles de un copolímero de metacrilato que posee maleimidias reactivas entrecruzado con un derivado trifuncional de furano. Las películas de este copolímero exhiben una gran capacidad de autoreparabilidad, fuerza mecánica y recuperación de las propiedades viscoelásticas en superficies con microcortes (Jung & Oh, 2017). Otros copolímeros de metacrilato con características similares han sido reportados, como es el caso del copolímero de metacrilato con grupos laterales de furfural que reacciona con maleimidias para formar una red entrecruzada. El copolímero fue sintetizado por i) polimerización radical con una posterior modificación de acoplamiento ii) adición de radical tiol-ene inducido térmicamente. En esta investigación la reacción de formación del cicloaducto se llevó a cabo a temperaturas de 50-

100°C mientras que, su desacoplamiento a temperaturas mayores que 125 °C (Jung et al., 2017). Por otro lado, se preparó un material con propiedades de autoreparabilidad formado a partir de un terpolímero en bloque de poli(furfuril metacrilato)-b-poli(dimetil siloxano)-b-poli(furfuril metacrilato) (Pramanik et al., 2017).

1.2.10. Antecedentes de la Síntesis de Quitosana Modificada con Derivados de Furano

Los hidrogeles basados en Cs han recibido una gran atención debido a que provienen de fuentes renovables, poseen propiedades antimicrobianas, son biocompatibles y biodegradables por las enzimas humanas. Además, este tipo de biomateriales tiene la capacidad de acarrear biomoléculas y proporcionar una alta rigidez y resistencia cercana a la de los tejidos naturales, características cruciales para aplicaciones como la liberación de fármacos o la ingeniería de tejidos. Principalmente, los hidrogeles basados en Cs se producen mediante reticulación iónica debido al carácter catiónico del polímero. Sin embargo, la reticulación covalente de los hidrogeles presenta algunas ventajas significativas, tales como propiedades mecánicas o estabilidad mejorada de la red, cuestiones importantes en algunas aplicaciones tales como la administración sostenida de fármacos. Para estos fines, se ha reportado la reticulación covalente de hidrogeles a base de Cs empleando agentes de reticulación bifuncionales como glutaraldehído, glioxal, genipinina, ácido oxálico, etc. Sin embargo, la investigación de nuevos métodos de entrecruzamiento covalente de hidrogeles basados en Cs se ha centrado principalmente en el uso de entrecruzantes no tóxicos y en el control de la densidad de entrecruzamiento. En este sentido, la utilización de reacciones de QC para la modificación de la Cs y en lo particular la cicloadición de DA, se ha utilizado para generar hidrogeles con propiedades interesantes para la biomedicina. Por ejemplo, la reacción de DA y RDA puede emplearse para proteger o desproteger grupos funcionales; además, el equilibrio DA/RDA puede explotarse para la preparación de materiales degradables o autoreparables (Gregoritz & Brandl, 2015).

Las estrategias sintéticas propuestas para la incorporación de grupos furanos previo a la modificación de QC son: A) reacción entre los grupos epóxicos de furfuril glicidil éter y los grupos aminos libres del polímero, Figura 5a (García-Astrain *et al.*, 2014; García-Astrain, González, *et al.*,

2016; García-Astrain, Guaresti, *et al.*, 2016); B) aminación reductiva y unión covalente de furfural a los grupos amino libre de la Cs. Figura 5b (Guaresti *et al.*, 2017, 2018; Montiel-Herrera *et al.*, 2015a) y C) protección de los grupos amino de la Cs utilizando anhídrido ftálico y posterior reacción con furfural propargil éter mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada con Cu(I), Figura 5c. (K. Kurita *et al.*, 2002; Montiel-Herrera *et al.*, 2015b).

A partir de la estrategia de incorporación del grupo furánico en Cs mediante amidación reductiva, se han formado hidrogeles por cicloadición de DA utilizando derivados de maleimidas mono y bifuncionales tales como, bismaleimida (Montiel-Herrera *et al.*, 2015a) y una maleimida modificada con alanina (Montiel-Herrera *et al.*, 2015a; H. Zhang *et al.*, 2017) en donde, se obtuvieron hidrogeles a 85 y 65 °C, respectivamente. En todos los casos, las muestras sintetizadas a partir de un mayor grado de sustitución de la Cs con furfural, así como con una mayor proporción de maleimida, presentaban hidrogeles más fuertes. Adicionalmente, bajo esta estrategia se prepararon redes termorreversibles de un hidrogel doblemente entrecruzado. La obtención de estos hidrogeles se basó en la combinación de efectos de coordinación entre un polímero *N*-furfural-Cs modificado con catecol con Fe³⁺ y posterior, reacción de cicloadición de DA con PEG-bismaleimida (S. Li *et al.*, 2018, p.).

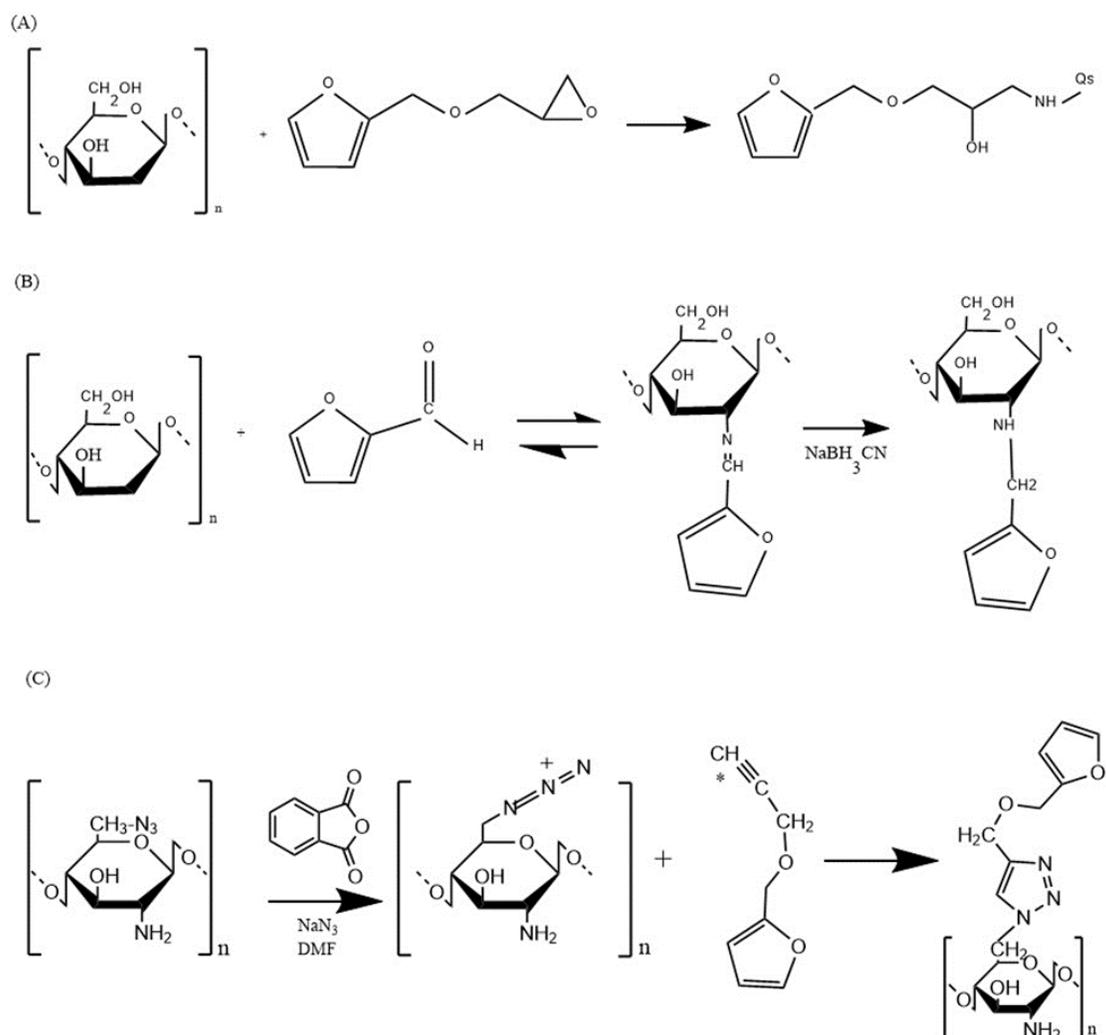


Figura 4. Estrategias sintéticas propuestas para la obtención del derivado pre-click de Cs con furano. A) reacción entre los grupos epoxi del furfuryl glicidil éter y los grupos amino libres del polímero; B) aminación reductiva en un proceso de dos pasos en donde los grupos amino libres de la Cs se unen covalentemente a furfural a temperatura ambiente; C) protección de los grupos amino de la Cs utilizando anhídrido ftálico y posterior reacción con furfuryl propargil éter mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen catalizada con Cu(I).

1.2.11. Hidrogeles Autoreparables

En los materiales poliméricos, la presencia de grietas y fracturas conlleva a la ruptura de enlaces (covalentes y no covalentes) de la superficie de la zona dañada. En este sentido, el proceso de autoreparabilidad corresponde a la restauración de la estructura y propiedades iniciales del material

dañado. Tal recuperación puede ocurrir de manera espontánea o por la aplicación de un estímulo (radiación, calor, agua). En la obtención de polímeros autoreparables intervienen eventos físicos o químicos a nivel molecular. Entre los eventos físicos que tienen lugar dentro del proceso de autoreparabilidad se encuentran la difusión de las cadenas y efectos de memoria de forma. Por el contrario, los procesos predominantemente químicos incluyen supramoleculares, así como, de enlaces covalentes dinámicos (F. Zhang *et al.*, 2018).

La incorporación de enlaces covalentes dinámicos se da a partir de dos tipos de reacciones: i) la reacción covalente reversible general y ii) la reacción covalente reversible dinámica (formación de productos con tipos idénticos de enlaces). La reacción covalente reversible general incluye reacción de adición reversible; a) condensación reversible; b) reacción de reducción reversible, etc., como la reacción de DA; c) reacción de oxidación de enlaces sulfhidrilo y d) formación de enlaces imina. La reacción covalente dinámica reversible implica el intercambio de componentes entre los reactivos, lo que da como resultado la formación de nuevos productos con tipos idénticos de enlaces covalentes. Entre este tipo de reacciones se incluyen reacciones de intercambio reversible, fisión o recombinación reversibles, etc., como las reacciones intercambio de a) éster; b) enlace disulfuro y c) disulfuro-tiol. Existe una diferencia significativa entre los dos tipos de reacciones covalentes reversibles. En general, en las reacciones covalentes reversibles se generan nuevos enlaces covalentes dinámicos a partir de reactivos distintos, generalmente bajo diferentes condiciones (temperatura, pH, etc.). Por el contrario, las reacciones directa e inversa de la reacción covalente dinámica reversible pueden desencadenarse bajo el mismo estímulo y no se generan nuevos enlaces covalentes.

Wool y O'Connor (1981) establecieron un modelo físico que comprende el mecanismo general seguido por los materiales autoreparables que consiste en: i) reorganización estructural de la superficie dañada; ii) mojabilidad; iii) reptación y iv) aleatorización de las cadenas y/o formación de interacciones químicas. En superficies frescas pueden ocurrir procesos adicionales debidos al tiempo, temperatura y medio ambiente, lo que propicia cambios en la morfología del material (Hager & Zechel, 2020).

En primera instancia, ante la ruptura del material se da la reorganización estructural de la red, lo que conlleva a su difusión, así como, posterior modificación de la composición de la superficie dañada. La reorganización estructural de la red a menudo influye en la eficacia de la reparación lo largo del tiempo. Las siguientes etapas del proceso de autoreparabilidad consisten en el aumento de la

superficie de contacto y humectabilidad del área dañada. El fenómeno de humectabilidad tiene como finalidad, mantener el contacto entre ambas superficies dañadas a partir de la formación de interacciones intermoleculares. Además, está presente en la restauración de las propiedades mecánicas del sistema. Posteriormente, la reptación (o inter-difusión) de las cadenas poliméricas entre ambas superficies dañadas y finalmente, el ordenamiento al azar de las cadenas. Existen factores determinantes en la eficacia de la autoreparabilidad como a) el tiempo, el cual influye en la reptación de las cadenas poliméricas; b) la masa molecular y c) la movilidad, que mejoran la eficiencia de la autoreparación (Wool, 2008). En la Figura 6 se observa un esquema del mecanismo de autoreparabilidad.

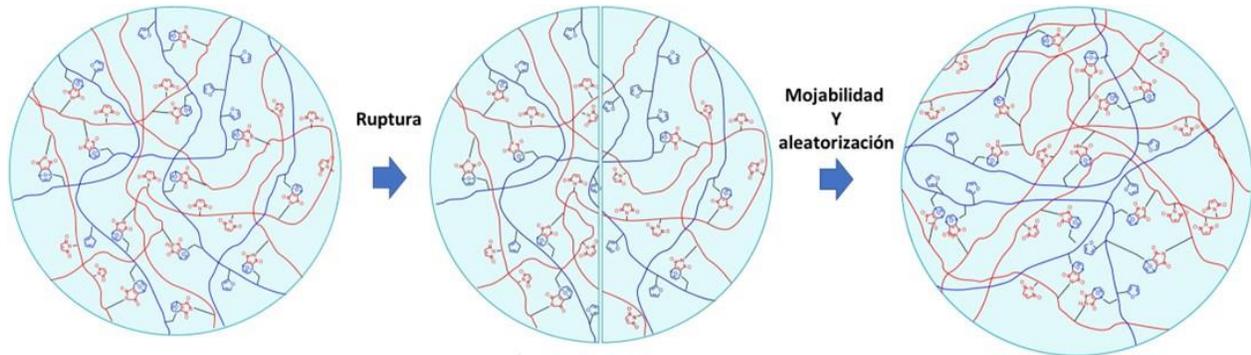


Figura 5. Mecanismo de autoreparabilidad de los hidrogeles obtenidos a partir de la reacción de DA.

1.2.12. Punto de Gelificación

Como ya se ha expuesto, un gel es un material polimérico entrecruzado mediante enlaces químicos o físicos formando retículos tridimensionales que poseen propiedades de líquidos y sólidos. En este documento nos vamos a limitar al proceso de gelificación de hidrogeles químicos. La importancia del conocimiento de estos materiales y en particular la determinación del punto crítico de gelificación rebasa el ámbito de interés científico, debido a su enorme influencia en procesos industriales de fabricación de materiales, así como para el procesamiento de polímeros entrecruzados. Existen varias teorías que ayudan a predecir el punto gel a medida que las

macromoléculas van creciendo, así como los cambios que tienen lugar en los modos y tiempos de relajación. Nos vamos a circunscribir a aquellas que permiten su determinación mediante experimentos reológicos.

Los materiales poliméricos se caracterizan por exhibir espectros de relajación amplios, reflejo de las especies poliméricas presentes (Figura 7). Definamos el grado de entrecruzamiento, p , como la relación de entrecruzamientos químicos respecto al número total de posibles enlaces. Antes del punto de gelificación ($0 < p < 1$), el sistema que se está entrecruzando presenta movimientos cada vez más lentos a medida que los clústeres aumentan de tamaño, lo cual va acompañado de un incremento de sus valores de viscosidad. Cercano al punto crítico, el tiempo de relajación crece bruscamente, los módulos de relajación ya no son independientes, y no es posible identificar un tiempo de relajación característico. El punto de gel se alcanza cuando el grupo molecular más grande diverge hasta un tamaño infinito, del tamaño del reactor. Esto define el valor umbral, p_c , como la conversión crítica de gelificación. La teoría clásica propuesta por Stockmayer, que fue desarrollada en la década de 1940 y que puede describirse como la percolación en una dimensión infinita, predice adecuadamente el punto de gelificación, que corresponde al punto crítico de transición de fase (Stockmayer, 1943).

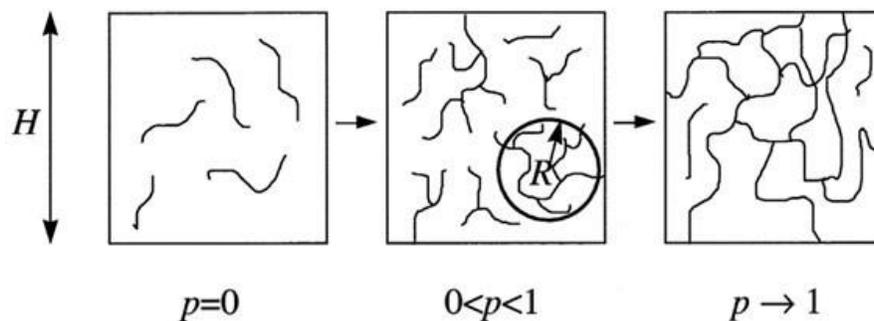


Figura 6. Esquema del crecimiento de los clústeres durante la reticulación. Cuando $p = 0$, solo hay monómero. Con el aumento de la reticulación, p , la conectividad aumenta y los clústeres moleculares (con radio R) van aumentando su tamaño. En estado sólido la red abarca toda la muestra, $2R \rightarrow H$ (Tomado de: H. Winter & Mours, 1997).

En el punto crítico de gelificación, las propiedades de flujo de cizalla en condiciones de flujo estacionario es un indicador sensible de la cercanía del punto de gel (Figura 8). La viscosidad de cizalla cero, η_0 , y el módulo de equilibrio, G_e , crecen potencialmente, con exponentes críticos s y z

$$\eta_0 \propto (p_c - p)^{-s} \quad \text{para el sol, } p < p_c$$

$$G_e \propto (p - p_c)^z \quad \text{para el gel, } p > p_c$$

La viscosidad de la fracción sol aumenta debido al tamaño del clúster divergente. El módulo de equilibrio aumenta gradualmente ya que una fracción creciente de las moléculas se une y, por lo tanto, se fortalece la muestra que abarca todo el retículo permanente.

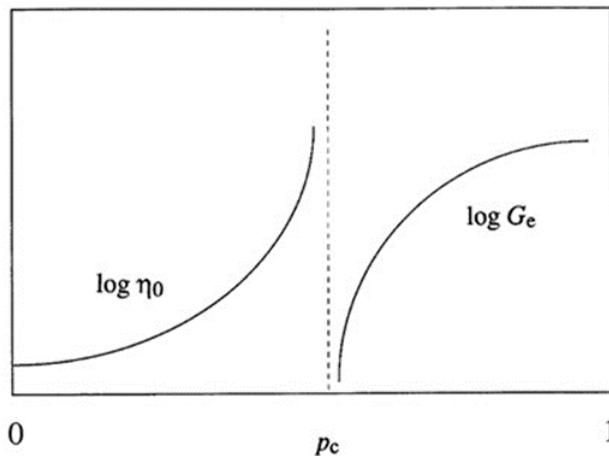


Figura 7. Esquema de la divergencia de la viscosidad de cizalla cero, η_0 , y el módulo de equilibrio, G_e . El punto gel está marcado con p_c (Tomado de: H. Winter & Mours, 1997)

Hasta el momento no ha sido posible modelar toda la evolución de la viscoelasticidad lineal en una sola ecuación constitutiva. Sin embargo, el conocimiento del comportamiento mecánico en el punto gel puede ser suficiente para su determinación experimental.

En 1982, Tung y Dynes propusieron el punto de cruce $G' - G''$ para detectar el punto gel. Sin embargo, en ensayos multifrecuencia este punto de cruce depende de la frecuencia y es obvio que el punto de gel no puede depender de la frecuencia de observación (Tung & Dynes, 1982).

Años más tarde, Winter y Chambon proponen un método para la determinación reológica del punto crítico de gelificación. Esto fue posible cuando Chambon logró detener experimentalmente la

reacción de reticulación de muestras delgadas de polidimetilsiloxano, con lo cual pudo preparar un conjunto de muestras con un grado fijo de reticulación antes, cerca y después del punto gel (Chambon & Winter, 1985). A partir de estos experimentos, estos autores desarrollaron una teoría que da soporte a la determinación reológica del punto gel. En este caso, los datos G^* son convertidos del dominio de frecuencia al dominio del tiempo. Los resultados del módulo de relajación resultante muestran un comportamiento como el ilustrado en la Figura 9. La regularidad de los módulos de relajación es sorprendente. Se puede apreciar que antes del punto de gel, el medio puede considerarse como un líquido para el cual ($G' \sim \omega^2$ y $G'' \sim \omega$). Conforme avanza la reacción de reticulación, existe un instante en el que el valor de $\tan(\delta)$ es independiente de la frecuencia y mayor que uno (Chambon & Winter, 1987). Después del punto de gel, el medio se considera equivalente a un sólido elástico.

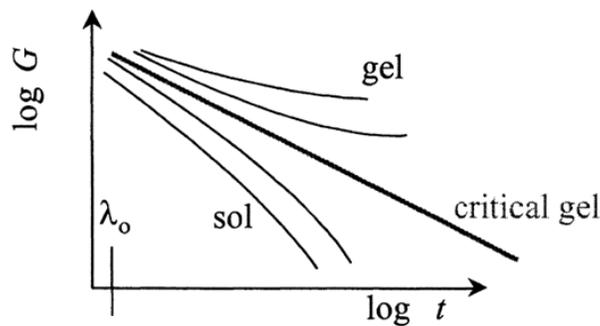


Figura 8. Módulo de relajación del gel en la vecindad del punto crítico de gelificación (Tomado de: H. H. Winter, 2002)

En el punto gel, G' y G'' exhiben una dependencia de ley de potencia con la frecuencia, ω , del tipo $G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^n$. Eso significa que en el punto gel la $\tan(\delta)$ es independiente de la frecuencia, por lo que en un experimento multifrecuencia las curvas de $\tan(\delta)$ pasan a través de un punto único. En este caso, “n” es el exponente crítico de relajación.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} = \tan \left(\frac{n\pi}{2} \right)$$

De este modo, la medición simultánea de la $\tan(\delta)$ a varias frecuencias proporciona un método conveniente de interpolación para determinar el punto gel, el cual se conoce como el criterio de Winter-Chambon. Desde un punto de vista experimental, para el estudio de sistemas entrecruzantes, los ensayos reológicos dinámicos a diferentes frecuencias son entonces apropiados para la determinación del punto de gel. Lo anterior a condición de que la deformación se mantenga dentro de los límites de la viscoelasticidad lineal, y la tensión sea baja para evitar cualquier posibilidad de romper la delicada red en sus etapas intermedias (Holly *et al.*, 1988).

1.2.13. Efecto de la Temperatura Sobre la Cinética de Reacción

La reacción de DA y RDA pueden estudiarse mediante técnicas espectroscópicas (Liu *et al.*, 2013). Gandini, Coelho, y Silvestre (2008) estudiaron la cinética de la reacción de las sustancias modelo, *N*-metilmaleimida y furfural acetato por espectroscopía UV-Vis a 293 nm. Al iniciar la reacción, la formación del aducto de DA rompe la conjugación de la maleimida lo que resulta en el desplazamiento hipsocrómico del espectro de absorción y decremento de la intensidad de las bandas a 293 nm para la DA e inversamente para RDA. Por otro lado, la aparición de un punto isosbético, indicó que la formación del aducto no está acompañada por reacciones secundarias. A partir de los datos de absorbancia a 293 nm, se determinó que la reacción sigue una cinética de pseudo primer orden. Los resultados para este modelo sugieren que la constante de velocidad se favorece con el aumento en la temperatura, y que por encima de los 90 °C inicia la RDA.

Empleando el mismo enfoque se monitoreó la reacción entre poli(estireno-*co*-furfural metacrilato) y bismaleimida. De los datos obtenidos se determinó que la reacción sigue una cinética de segundo orden. Además, se obtuvieron espectros de ^{13}C -RMN que muestran que al término de la reacción de gelificación algunas maleimidias quedan sin reaccionar. A partir de los resultados obtenidos por UV-Vis y ^{13}C -RMN, se calculó la constante de velocidad (Goiti *et al.*, 2004).

No obstante, algunos inconvenientes de la espectroscopia de UV-Vis es que no brindan información que permita discriminar entre los productos intermediarios y los finales, ni sobre sus propiedades. Por otro lado, la resonancia magnética proporciona una idea sobre la formación y ruptura del aducto. Como es el caso del estudio desarrollado por Rulísek *et al.* (2005) quienes estudiaron la cinética de la reacción por ^1H -RMN y obtuvieron los valores de las constantes de velocidad de los

estereoisómeros *endo* y *exo*. Los resultados obtenidos muestran que la reacción tiene una mayor selectividad por los estereoisómeros *endo*. Adicionalmente, la cinética de reacción también puede ser estudiada a partir de mediciones reológicas proporcionando un enfoque cuantitativo para estudiar la DA y la RDA. La combinación de métodos permite la discriminación entre la formación del aducto intermediario y el aducto final.

Polgar *et al.*, (2017) estudiaron la cinética de la reacción entre furano injertado con caucho y una bismaleimida a partir de barridos dinámicos de frecuencia a diferentes temperatura A partir de los resultados obtenidos se determinó que la ecuación seguía una cinética de segundo orden y se construyó un gráfico de Arrhenius. Con esta información se calculó el valor de la energía de activación y la constante de velocidad para las reacciones de DA y RDA. Los valores calculados para la energía de activación de la RDA son comparable con los valores reportados por la literatura científica que van de 41-161 kJ/mol (Gheneim *et al.*, 2002; Herndon *et al.*, 1967; Jurczak *et al.*, 1985). Los valores de la constante de velocidad se llevaron a un gráfico de van't Hoff para encontrar los cambios de entalpía y entropía, así como, la concentración del cicloaducto.

Diaz et al. (2017) usaron microcalorimetría isotérmica para calcular la conversión de los grupos furano, empleando la constante de velocidad, que se expresó en términos de la constante de equilibrio. Mientras que, por calorimetría de barrido diferencial se calculó la tasa de conversión, por medio de la entalpía de reacción. Los datos sugieren que, a altas temperaturas la reacción de DA avanza con rapidez, pero con el tiempo, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia RDA lo que, da como resultado conversiones inferiores. Por el contrario, para temperaturas más bajas, la reacción avanza lentamente hacia conversiones más altas.

Adicionalmente, los parámetros termodinámicos obtenidos a partir del estudio de la cinética de reacción de sistemas DA sugieren que los enlaces covalentes σ autoreparados, son más débiles que otros enlaces covalentes en el sistema. Esto significa que cuando el sistema sufre daño físico, es más probable que los enlaces σ de los cicloaductos reformados se rompan en lugar de otros enlaces de la red (Adzima *et al.*, 2008).

1.2.14. Efecto del Solvente en la Cinética de la Reacción de Cicloadición de Diels-Alder

Las constantes de velocidad y estereoselectividad de las reacciones de Diels-Alder son moderadamente sensibles a los cambios en la naturaleza del medio de reacción. Se ha reportado que estas se aceleran fuertemente en medio acuoso en un factor de hasta 1.3×10^4 veces (Kong & Evanseck, 2000). Así mismo, las constantes de velocidad pueden variar en proporción con la polaridad del disolvente orgánico empleado para la reacción. En solventes acuosos y no polares, la reacción se favorece entálpica y entrópicamente por el aumento de interacciones “hidrofóbicas forzadas”. Estas interacciones inter e intramoleculares son favorecidas por la formación de una cavidad hidrofóbica hidratada entre el dieno y dienófilo (Blokzyl *et al.*, 1991).

Además del aceleramiento de la reacción, la selectividad por la formación de los estereoisómeros *endo* se incrementa cuando esta se realiza en condiciones acuosas. Breslow y col analizaron el rendimiento y formación de los productos *endo* y *exo* de la reacción de DA entre ciclopentadieno y una serie de dienófilos (Breslow *et al.*, 1983). La proporción de los productos *endo/exo* obtenidos utilizando los reactivos puros, fue de 2.8:1 y 3.85:1 mientras que, cuando se utilizó agua como solvente estos fueron de 13.7:1 y 21.4:1 para los dienófilos dimetil maleato y butenona, respectivamente. Aunque en ambos sistemas, uno o más de los reactivos presentaba baja solubilidad en agua, se favoreció la formación de los productos *endo*. Por otro lado, Kong y col. evaluaron el efecto del agua sobre la aceleración y selectividad de la reacción de DA entre 1,3-butadieno y acroleína (Kong & Evanseck, 2000). La selectividad de los productos *endo/exo* es consistente con la teoría del orbital molecular de frontera y las reglas Woodward-Hoffman (Jasiński, 2016b).

1.3. Hipótesis

La reacción de Diels-Alder permitirá obtener hidrogeles entre *N*-furfuril-quitosana y derivados de PEG-maleimida de diferente funcionalidad, con características viscoelásticas controladas y propiedades de auto-reparación

1.4. Objetivo General

- Preparar y caracterizar reológicamente hidrogeles de *N*-furfuril-quitosana y derivados de PEG-maleimida entrecruzados mediante la cicloadición de Diels-Alder, con características viscoelásticas controladas y propiedades de auto-reparación.

1.5. Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar derivados *N*-furfuril de la quitosana con diferentes grados de sustitución
- Investigar la cinética de la reacción de Diels-Alder durante la gelificación
- Estudiar el proceso de gelificación entre la *N*-furfuril-quitosana y PEG-(maleimida) y las características viscoelásticas de estos hidrogeles mediante reología dinámica
- Evaluar las propiedades de autoreparación de estos hidrogeles

1.6. Sección Integradora del Trabajo

Esta tesis doctoral está integrada por dos artículos científicos relacionados con los objetivos planteados en la presente investigación.

Artículo 1: Chitosan Hydrogels Based on the Diels–Alder Click Reaction: Rheological and Kinetic Study. Artículo publicado en la revista *Polymers*, editorial MDPI, el 16 de marzo del 2022. El artículo engloba los 3 primeros objetivos del trabajo de tesis. Se prepararon hidrogeles transparentes de *N*-furfuril quitosana entrecruzados mediante la reacción de Diels-Alder con derivados PEG-(maleimida). El proceso de gelificación y las características viscoelásticas de estos hidrogeles se estudiaron mediante reología dinámica. Aplicando el criterio de Winter y Chambon, se estimaron los tiempos de gelificación a diferentes temperaturas y se calculó la energía de

activación. Cuanto mayor es la temperatura de gelificación, mayor es la velocidad de reacción. La densidad de reticulación y las propiedades elásticas de los hidrogeles parecen estar controladas por la difusión de los segmentos del polímero, más que por la cinética de la reacción. Un aumento de la concentración de cualquiera de los dos grupos funcionales va acompañado de una mayor densidad de reticulación, independientemente de la relación molar maleimida:furano. Una vez formado, el hidrogel mostró una mejora en sus propiedades mecánicas a medida que aumenta la temperatura hasta 70 °C. Por encima de esta temperatura, se produce una caída de los valores del módulo de almacenamiento, lo que indica que existe un proceso opuesto a la reacción de Diels-Alder, muy probablemente la reacción de retro-Diels-Alder.

Artículo 2: "Diels–Alder crosslinked hydrogels: Is rheology a suitable method to study the self-healing process?"

Artículo enviado a la revista ACS Macro Letters, de la editorial American Chemical Society el día 31 de mayo del 2022. El presente artículo responde al objetivo número 4. En esta investigación se evaluó la utilización de la reología dinámica en el estudio del proceso de auto-reparación de los hidrogeles de *N*-furfuril quitosana con derivados bifuncionales de PEG-(maleimida). Durante los experimentos reológicos, los hidrogeles fueron sometidos sucesivamente a tres ciclos alternos de deformación con una tensión de cizalla con valores por encima y por debajo del punto de fluencia. Esto resultó en la desintegración del hidrogel, seguida de una auto-reparación casi instantánea. Contrario a los resultados obtenidos visualmente, y por microscopía óptica, en los que el proceso de auto-reparación es notablemente más lento, en reología, una fuerte tensión de cizalla conduce a la degradación mecánica del hidrogel, con la consiguiente escisión homolítica de las cadenas poliméricas y la formación de radicales libres. Por lo tanto, es posible concluir que el uso de la reología como técnica para describir y cuantificar la auto-reparación carece de fundamento científico y no es apropiada para comprender y analizar este proceso, especialmente en hidrogeles entrecruzados químicamente.

2. CHITOSAN HYDROGELS BASED ON THE DIELS–ALDER CLICK REACTION: RHEOLOGICAL AND KINETIC STUDY

Cintha Ruiz-Pardo¹, Luisa Silva-Gutiérrez¹, Jaime Lizardi-Mendoza¹, Yolanda López-Franco¹
Carlos Peniche-Covas² and Waldo Argüelles-Monal^{1,*}

¹ Grupo de Investigación en Biopolímeros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo 83304, Sonora, Mexico; cinthya.ruiz@estudiantes.ciad.mx (C.R.-P.); lsilva@ciad.mx (L.S.-G.); jalim@ciad.mx (J.L.-M.); lopezf@ciad.mx (Y.L.-F.)

² Facultad de Química, Universidad de la Habana, Vedado, La Habana 10400, Cuba; cpeniche2015@yahoo.com

* Correspondence: waldo@ciad.mx

Polymers 2022, 14, 1202.

<https://doi.org/10.3390/polym14061202>

Article

Chitosan Hydrogels Based on the Diels–Alder Click Reaction: Rheological and Kinetic Study

Cintha Ruiz-Pardo ¹, Luisa Silva-Gutiérrez ¹, Jaime Lizardi-Mendoza ¹, Yolanda López-Franco ¹, Carlos Peniche-Covas ² and Waldo Argüelles-Monal ^{1,*}

¹ Grupo de Investigación en Biopolímeros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo 83304, Sonora, Mexico; cinthya.ruiz@estudiantes.ciad.mx (C.R.-P.); lsilva@ciad.mx (L.S.-G.); jalim@ciad.mx (J.L.-M.); lopezf@ciad.mx (Y.L.-F.)

² Facultad de Química, Universidad de la Habana, Vedado, La Habana 10400, Cuba; cpeniche2015@yahoo.com

* Correspondence: waldo@ciad.mx

Abstract: The Diels–Alder reaction is recognized to generate highly selective and regiospecific cycloadducts. In this study, we carried out a rheological and kinetic study of *N*-furfuryl chitosan hydrogels based on the Diels–Alder click reaction with different poly(ethylene)glycol-maleimide derivatives in dilute aqueous acidic solutions. It was possible to prepare clear and transparent hydrogels with excellent mechanical properties. Applying the Winter and Chambon criterion the gel times were estimated at different temperatures, and the activation energy was calculated. The higher the temperature of gelation, the higher the reaction rate. The crosslinking density and the elastic properties seem to be controlled by the diffusion of the polymer segments, rather than by the kinetics of the reaction. An increase in the concentration of any of the two functional groups is accompanied by a higher crosslinking density regardless maleimide:furan molar ratio. The hydrogel showed an improvement in their mechanical properties as the temperature increases up to 70 °C. Above that, there is a drop in G' values indicating that there is a process opposing to the Diels–Alder reaction, most likely the retro-Diels–Alder.

Keywords: click chemistry; Diels–Alder reaction; chitosan; PEG-maleimide; furan; rheology



Citation: Ruiz-Pardo, C.;

Silva-Gutiérrez, L.; Lizardi-Mendoza, J.; López-Franco, Y.; Peniche-Covas, C.; Argüelles-Monal, W. Chitosan Hydrogels Based on the Diels–Alder Click Reaction: Rheological and Kinetic Study. *Polymers* **2022**, *14*, 1202. <https://doi.org/10.3390/polym14061202>

Academic Editors: Luminita Marin and Vitaliy V. Khutoryanskiy

Received: 25 January 2022

Accepted: 9 March 2022

Published: 16 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

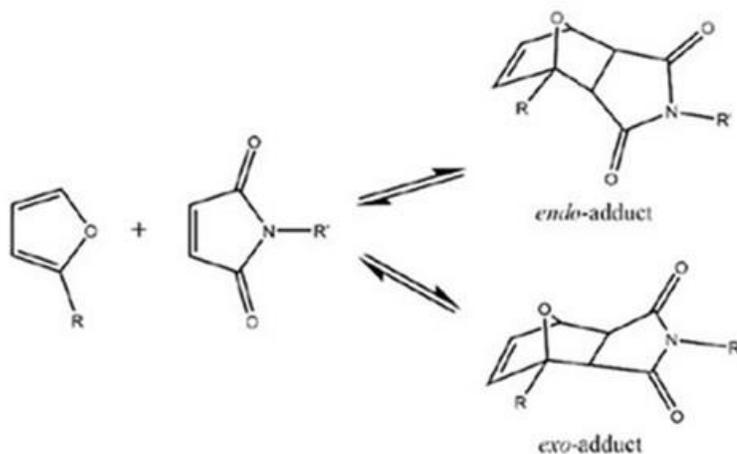
Chitosan is one of the most abundant polysaccharides in nature. It exhibits biological properties such as low toxicity, mucoadhesivity, biocompatibility, and biodegradability, which make it attractive for use as a drug delivery vehicle [1,2]. Due to the presence of abundant amino ($-NH_2$) and hydroxyl ($-OH$) groups, chitosan can be chemically crosslinked giving rise to hydrogels with interesting properties for a wide variety of applications [3–5]. Chitosan hydrogels can also be prepared by the Diels–Alder reaction [6–9]. Many chitosan derivatives have been developed to improve the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs, including chitosan-g-poly(ethylene) glycol [10,11]. A wide range of poly(ethylene)glycol (PEGs) with functionalized end groups (e.g., azides, thiols, maleimides, carboxylic acids, hydroxyls, and epoxides) are currently available, increasing the attractiveness of their use in biomedical and biomaterial applications [12]. PEG-based hydrogels have shown interesting properties for their implementation in biological applications such as low toxicity and rapid elimination after oral administration.

An alternative and relatively novel approach to classical derivatization methods is the use of click chemistry reactions. The term click chemistry was first coined by K. B. Sharpless in 2001 to describe the rapid formation of crosslinked networks from modular units [13]. Click chemistry reactions are characterized by high yields and proceed without the formation of by-products. These reactions are stereospecific and thermodynamically favorable. Currently, the use of click chemistry in polymer research is an interesting strategy to design polymer-based hydrogels, drug and gene delivery systems, scaffolds for tissue

engineering, among other materials [14,15]. This is due to the advantages offered by these reactions to control the properties of hydrogels, their degree of crosslinking, and in some cases, thermal reversibility.

Among click chemistry reactions, the Diels–Alder (DA) coupling reaction involves a highly selective [4 + 2] cycloaddition between a conjugated diene and a dienophile to form a stable cycloadduct. The Diels–Alder reaction must be considered as a chemical equilibrium, where the direct reaction proceeds at low temperatures (normally below 90 °C) and the reverse reaction that takes place at higher temperatures as a consequence of its higher activation energy [16]. The structural characteristics of furan and its derivatives—together with its natural and renewable origin—make it the ideal dienic reagent for the Diels–Alder reaction [17]. Today, the most studied diene/dienophile system is furan/maleimide, which can react through the Diels–Alder cycloaddition and is, in many cases, reversible at temperatures above 100 °C [18,19].

It is well known that the cycloadduct formed during the Diels–Alder reaction has two stereoisomers, *endo* and *exo*. Furans participate in Diels–Alder reactions with dienophiles, producing *exo*-cycloadducts—which are thermodynamically more stable due to less steric hindrance—than their counterpart, *endo*-adducts, which are kinetically favored (Scheme 1).



Scheme 1. Diels–Alder cycloaddition reaction between furan and maleimide derivatives.

In this article, the rheological behavior, and aspects of the kinetics of the Diels–Alder crosslinking reaction between *N*-furfuryl chitosan and PEG-maleimide derivatives—which takes place in an aqueous medium—are studied. The influence of temperature, the degree of polymerization, and functionality of PEG-maleimide derivatives on the reaction, as well as the influence of temperature on the mechanical properties of the formed hydrogel, is investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Chitosan with a degree of acetylation of 18% and weight-average molecular weight of 200 kDa was provided by Primex ehf (Siglufjordur, Iceland). Low polydispersity polyethylene glycol 2- and 4-arm maleimide derivatives were acquired from JenKem Technology, TX, USA. The characteristics of these PEG-maleimide derivatives are summarized in Table 1. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Deionized Type I ultrapure water with a conductivity lower than 0.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ was used in all experiments.

Table 1. Identification and characteristics of the poly(ethylene)glycol-maleimide derivatives.

Identification	f^1	Substitution 2 (%)	Molecular Weight (Polydispersity) 3	Purity 4 (%)
PEG(mal) $_2$ -2000	2	97.9	2084 (1.04)	99.2
PEG(mal) $_2$ -7500	2	98.1	7408 (1.03)	100
PEG(mal) $_4$ -10,000	4	94.7	10,160 (1.04)	98.0

$^1 f$: functionality. 2 Determined by $^1\text{H-NMR}$, reported by the supplier. 3 Molecular weights (polydispersity) by MALDI GPC, reported by the supplier. 4 Determined by HPLC, reported by the supplier.

2.2. Synthesis of *N*-Furfuryl-Chitosan (FCs)

The synthesis of *N*-furfuryl chitosan was carried out as described by Montiel-Herrera et al. with modifications [6]. Briefly, 2.58 g chitosan (12.17 -NH $_2$ mmol) was dissolved in 1000 mL of 2% aqueous acetic acid overnight. Next, 433 μL of furfural (5.23 mmol) was dropped under stirring into the Cs solution at room temperature and allowed to react for 4 h at pH 5. Then, 16 mL of a freshly prepared aqueous solution containing 0.987 g of NaH $_3$ BCN was slowly added with the aid of a peristaltic pump (Minipuls 3, Gilson, France), and the reaction was further conducted for 3 h. After the completion of the process, the chitosan derivative was precipitated with 1 M NH $_4$ OH until a pH~7–8 was attained, and successively washed with water until reaching a 0.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ conductivity, water:ethanol mixtures 40:60, 20:80 (*v:v*) and ethanol. Finally, the purified sample was dried at room temperature under vacuum (yield: 83%).

2.3. Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR)

The spectra were recorded with a Nicolet Protege team (System 460 E.S.P) FT-IR spectrometer (Madison WI, USA) by the accumulation of 64 scans with a resolution of 4 cm^{-1} . The attenuated total reflectance (ATR) module was used.

2.4. Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$)

High-resolution $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy was carried out on a Bruker Avance 400 spectrometer (Billerica, MA, USA) operating at 400 MHz, and 90° pulse was 14.0 ms. The spectra were registered at 25 °C. Samples of FCs were solubilized in D $_2$ O/DCI (polymer concentration \approx 6 mg/mL).

2.5. Rheological Studies

Dynamic viscoelastic measurements were carried out using an AR-G2 rheometer (TA Instruments, New Castle, DE, USA) equipped with a stainless-steel parallel plate geometry (diameter: 40 mm; gap: 1000 μm) and a Peltier system for temperature control.

A fresh FCs solution prepared the day before in acetic acid (2%) was mixed with the appropriate amount of the maleimide compound and stirred for a few minutes. The mole ratio of maleimide to furan groups, R, was chosen to be 0.25 or 0.5. Before loading the sample into the rheometer, it was centrifuged for 6 min at 15,000 $\times g$, to remove bubbles. A thin layer of low viscosity silicone oil was added around the periphery of the geometry plate to prevent the evaporation of the sample.

All experiments were performed isothermally, according to the following program: initially, a mechanical spectrum was recorded at 25 °C within a frequency range of $\omega = 0.1\text{--}100 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, followed by rapid heating of the sample up to the gelation temperature, typically in 30–45 s. The Diels–Alder reaction was then monitored isothermally by the variation of G' and G'' at three frequencies between 1 and 10 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. In all cases, a 2.5% strain was used, thus ensuring that measurements were performed within the linear viscoelastic region and avoiding damages to the gel that is forming. Unless otherwise stated, at the end of the crosslinking process a mechanical spectrum was accomplished at the gelation temperature, followed by another one at 25 °C under the same conditions as described above.

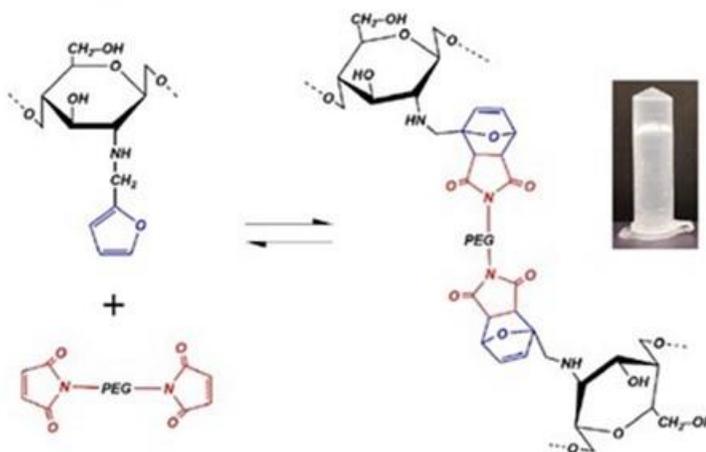
3. Results and Discussion

3.1. Diels–Alder Click Reaction for Chemical Crosslinking of Chitosan

Diels–Alder cycloaddition is one of the click chemistry reactions, allowing a high process control and valuable versatility. In macromolecular chemistry, it can be used for polymerization, polymer modification, gelation, and thanks to its dynamic character, advanced applications have also been proposed. There are studies in which this reaction is applied for the formation of chemical gels of polysaccharides in particular chitosan, rendering networks with interesting properties.

A synthetic pathway for grafting furan groups into the chitosan backbone under mild conditions with adequate regioselectivity has been proposed (Scheme S1) [6]. The derivative obtained was characterized by FTIR and $^1\text{H-NMR}$ spectroscopies (Figures S1 and S2, respectively). In the FTIR spectra there are three bands at 746, 821, and 901 cm^{-1} due to the presence of the furan ring on the *N*-furfuryl chitosan. Meanwhile, the NMR spectrum of the derivative shows the characteristic signals of the furan ring between 6.25 and 7.5 ppm. From the latter, a degree of *N*-furfuryl substitution of 21% was estimated.

In the present study, polyethylene glycol maleimide-terminated derivatives with different degrees of polymerization and functionalities were chosen (Table 1). The Diels–Alder reaction between *N*-furfuryl chitosan and these PEG-maleimide derivatives gives clear and transparent hydrogels, with excellent mechanical properties, as can be appreciated in Scheme 2.



Scheme 2. Diels–Alder reaction between *N*-furfuryl chitosan and PEG-maleimide compounds.

The FTIR spectra of the *N*-furfuryl chitosan, PEG-bismaleimide, and the Diels–Alder adduct hydrogel are presented in Figure S3. The bismaleimide compound exhibits the characteristic bands of poly(ethylene glycol)s and maleimide groups, particularly the bands at 1707 cm^{-1} (C=O stretching), 1466 cm^{-1} (C=C stretching), 1341 cm^{-1} (C–N stretching), 1150 cm^{-1} (C–N–C bending), 840 cm^{-1} (C–H wagging vibration), and 695 cm^{-1} (=C–H out-of-plane bending) [20–22]. The chitosan derivative, among others, displays the signals corresponding to the furan ring: 1374 cm^{-1} (C=C furan ring stretching vibration), 895 cm^{-1} (out-of-plane deformation vibration), and 660 cm^{-1} (furan ring deformation). After the crosslinking Diels–Alder reaction, it is evident that maleimide and furan characteristic bands are all diminished in the adduct spectrum, confirming the consumption of the maleimide and furan groups. Moreover, there are new peaks at 1454 cm^{-1} (C=C stretching), 1258 cm^{-1} (C–O symmetric stretching), 947 cm^{-1} (C–H in-plane deformation), and 799 cm^{-1} (C–H out-of-plane deformation) [8,23,24]. These results confirm the crosslinking Diels–Alder reaction between *N*-furfuryl chitosan and PEG-bismaleimide, and the formation of the cycloadduct.

The hydrogel system formed by *N*-furfuryl chitosan (1%-w/w), PEG(mal)₂-7500, and a mole ratio of maleimide to furan groups of 0.25 was first selected. The dynamic mechanical spectra at 25 °C of the precursor solution, and that of the corresponding hydrogel prepared at 50 °C, are displayed in Figure S4. The viscoelastic behavior of the reaction mixture matches that of a concentrated polymer solution, with both G' and G'' showing frequency dependence (Figure S4a). Moreover, the frequency sweep of the resulting hydrogel is the typical mechanical spectrum of a crosslinked polymer system (Figure S4b): the storage modulus has no dependence on the frequency and is almost two orders of magnitude higher than G'' . This corroborates that the Diels–Alder reaction gives rise to a hydrogel with good mechanical properties, as it will be confirmed later.

3.2. Rheological Analysis of the Influence of Temperature on Diels–Alder Cycloaddition for Chemical Crosslinking

Among the different experimental parameters having a major effect on the Diels–Alder click reaction, temperature is of the utmost importance. Indeed, the Diels–Alder cycloaddition is, in fact, an equilibrium chemical process. The relationship between Diels–Alder and retro-Diels–Alder reactions determines many of their applications, as well as the mechanical properties of the resulting hydrogels.

The kinetics of the gelation process and the viscoelastic properties of the hydrogels prepared via the DA reaction between *N*-furfuryl chitosan and PEG-maleimide derivatives were then investigated by low deformation dynamic rheology, under isothermal conditions at temperatures between 50 and 90 °C.

In Figure 1, the evolution of the storage and loss moduli during the gelation at 50, 70, and 90 °C is presented. It is evident that, as the temperature increases, the time necessary to reach equilibrium decreases from 12 to around 2 h, while the equilibrium values of the storage modulus also diminish.

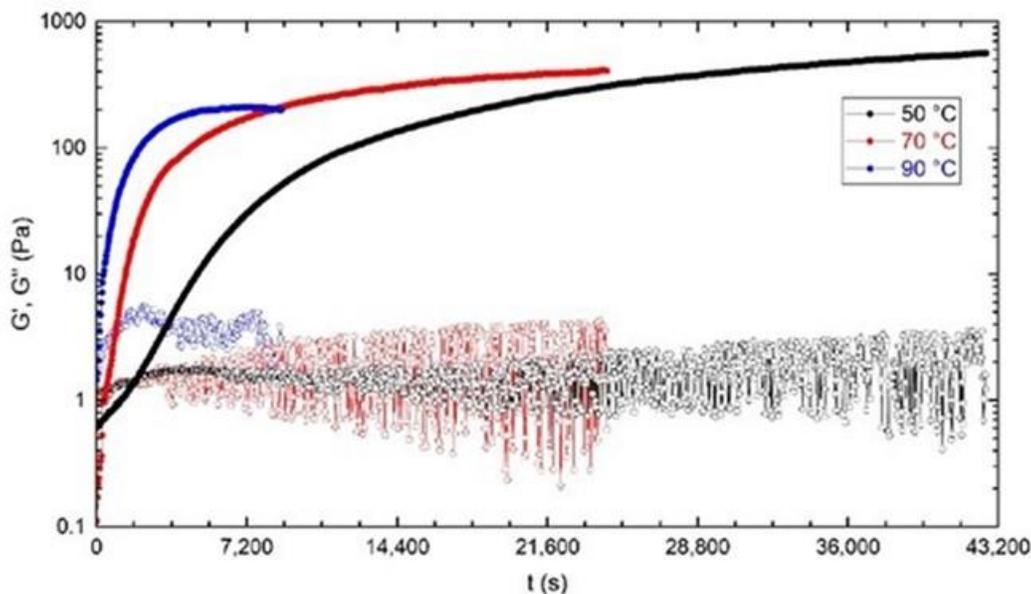


Figure 1. Evolution of storage modulus (G'), and loss modulus (G'') with time for the system *N*-furfuryl-chitosan (21% substitution degree) and PEG(mal)₂-7500. Polymer concentration: 1 wt.%, and $R = 0.25$. G' , closed symbols, and G'' , open symbols. Only traces for $\omega = 1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ are shown.

Polymeric materials are characterized by broad relaxation spectra, reflecting the variety of polymeric species present. Before the gel point, a crosslinking system exhibits increasingly slower movements as the polymeric crosslinked clusters increase in size, which is accompanied by an increase in their viscosity values. Near the critical point, the relaxation

time grows sharply, the relaxation modes are no longer independent, and a characteristic relaxation time cannot be identified anymore. The gel point is reached when the largest molecular group diverges to a theoretical infinite size, limited by the volume of the reactor.

At the critical gelation point, the shear flow properties under steady flow conditions are a sensitive indicator of the proximity of the gel point. The viscosity of the sol fraction increases due to the size of the divergent cluster. The equilibrium modulus gradually increases as an increasing fraction of the molecules binds and thus the sample spanning the entire permanent lattice is strengthened.

A common condition used to determine the isothermal gel time by rheology was suggested by Tung and Dynes as the $G'-G''$ crossover point, $\tan(\delta) = G''/G' = 1$ [25]. However, in multi-frequency tests, this crossover point is frequency dependent, and it is obvious that the gel point cannot depend on the frequency, as in our system (e.g., Figure S5).

Instead, Winter and Chambon have proposed another criterion, considering that at the critical gel point the system is neither in a viscous liquid state nor an elastic network [26]. Before the gel point, the medium can be considered as a liquid for which $G' \sim \omega^2$ and $G'' \sim \omega$. As the crosslinking reaction progresses, there is an instant—the critical gel point—at which G' and G'' exhibit a power-law dependence with frequency, ω , of the type $G'(\omega) \sim G''(\omega) \sim \omega^n$.

$$\tan\delta(\omega) = \frac{G_c''}{G_c'} = \tan \frac{n\pi}{2} \quad (1)$$

In this case, “ n ” is the critical relaxation exponent [27]. After the gel point, the reaction medium is considered equivalent to an elastic solid.

That means that at the critical gel point the $\tan(\delta)$ is independent of frequency, so in a multi-frequency experiment, the $\tan(\delta)$ curves pass through a single point. Thus, during a dynamic viscoelastic experiment, simultaneous measurement of $\tan(\delta)$ at several frequencies provides a convenient method of interpolation for determining the gel point, which is known as the Winter–Chambon criterion. This is under the condition that the deformation remains within the limits of linear viscoelasticity, and the stress is so low, as to avoid any chance of breaking the delicate network in its incipient stages [28].

Applying this approach, it was possible to assess the critical gel times for this hydrogel at temperatures between 50 and 90 °C. The estimation of the gel time at 50 °C is exemplified in Figure 2. According to the Winter and Chambon criterion, n , the critical relaxation exponent, equals 0.552. Values of n larger than 0.5 have been evaluated for stoichiometrically imbalanced gels, characterized with a crosslinker deficiency as in this case [29]. The critical relaxation exponent is known to be independent of temperature [30].

The values of the critical gel time for all temperatures, as well as those of the gel strength, S , are summarized in Table 2. The latter is a parameter depending on the material structure at the transition state and affects the linear constitutive viscoelastic equation. It could be estimated from G' at the intersection with G'' , and it is accepted that it varies with temperature [26,30,31]. As it can be appreciated, the reaction proceeds faster as the temperature increases up to 90 °C, while the strength of the gel decreases under the same conditions.

According to the theory of Winter and Chambon, the gel time should be interpreted as the time at which the critical sol-to-gel conversion occurs during chemical crosslinking under isothermal conditions. Gel times are an intrinsic property of the material at the critical gel point, in the sense that they do not depend on the method, but on the specific characteristics of the polymeric system, under the experimental conditions in which the process takes place. It is reasonable, therefore, to assume that—under the condition that there is only one reaction mechanism involved—the gel time can be considered a quantitative measure of the rate of the overall reaction [32].

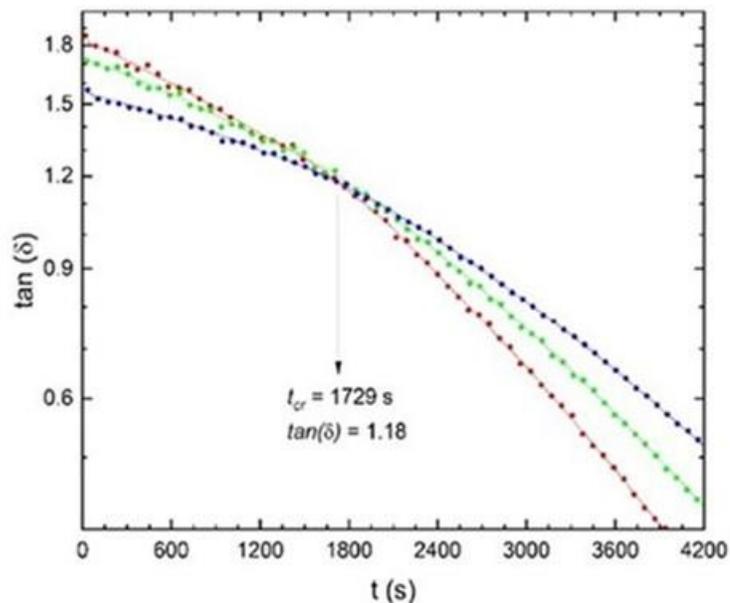


Figure 2. The loss tangent, $\tan(\delta)$, as a function of the reaction time during the Diels–Alder click reaction between *N*-furfuryl chitosan (21% degree of substitution) and PEG(mal)₂-7500 at 50 °C. The $\tan(\delta)$ curves at different frequencies crossover at the gel point ($\omega = 2.15, 4.64$ and $10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$; red, green, and blue, respectively). Polymer concentration: 1 wt.%, and $R = 0.25$.

Table 2. Critical gel times and the strength of the hydrogel at gelation for the system between *N*-furfuryl chitosan (1% *w/w*) and PEG(mal)₂-7500 with $R = 0.25$.

T_{gel} (°C)	t_{gel} (s)	S (Pa s ^{1/2})
50	1729	1.15
60	590	0.94
70	292	0.87
80	158	0.75
90	68	-

From the previous discussion, it could be understood that the gel time adequately reflects the kinetics of a chemical crosslinking process, such as the one that concerns us in this study. It is then possible to develop the following mathematical considerations on the kinetics of chemical gelation [32–34]. Given the concentration of each type of functional groups, C , the rate constant, k , and the kinetic order, n , the general equation for the reaction rate is expressed as:

$$-\frac{dC}{dt} = kC^n \tag{2}$$

Since we are interested in the kinetic expression at the gel point, Equation (2) should be integrated. The concentration of functional groups at the beginning of the reaction, t_0 , and at the gel point, t_{gel} , will be labeled as C_0 and C_{gel} , respectively.

$$kt_{\text{gel}} = \left[\frac{1}{(n-1)} \right] (C_{\text{gel}}^{1-n} - C_0^{1-n}) \tag{3}$$

The term on the right is a constant, and will be set equal to B , which makes the rate constant equivalent to $k = B/t_{gel}$. Being an expression of the kinetics of the reaction, its dependence on temperature obeys the Arrhenius equation with a dependence of this type:

$$k = \frac{B}{t_{gel}} = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (4)$$

where A is the pre-exponential factor, and R and T have their usual significance. Applying logarithms and rearranging, the following expression is attained:

$$\ln t_{gel} = \ln \frac{B}{A} + \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

which allows for a straightforward evaluation of the activation energy from the values of the gel time on isothermal experiments at different reaction temperatures.

This kinetic analysis should be valid under initial conditions in which the direct Diels–Alder reaction is the predominant one. The experimental conditions that must prevail before the critical gel point—particularly in aqueous media and low temperatures, compared to those of other systems—are not logical to be affected by the retro-Diels–Alder reaction since it would be denying the very fact of gelation. Beyond the gel point, when the mobility of the reacting species is severely restricted, it can be speculated that the probabilities of the reverse reaction will increase, affecting the mechanical properties of the final hydrogel.

Figure 3 depicts the dependence of gel time on temperature. It is evident that good correlation is attained within the temperature range under study. This result could be indicating that, at least under these experimental conditions, the retro-Diels–Alder reaction does not appear to be affecting the kinetics of the chemical crosslinking process as evidenced by rheological means. From this plot, the activation energy was calculated to be $76 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. This value is slightly higher than those found for similar systems by other authors. Normally, values between 30 and $55 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ have been reported [22,35–40]. This wide range of values in the activation energy could be explained by the specific differences between the chosen diene/dienophile, as well as by other important experimental conditions, such as the solvent or the bulk reaction. To our knowledge, the highest value that has been obtained is $67 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, for the bulk maleimide–furan DA reaction assuming second-order kinetics [41].

The present investigation was carried out in a dilute aqueous solution of acetic acid. It is known that the Diels–Alder reaction is considerably faster in water than in organic solvents [42–44]. Although there is still no single explanation, it is considered that this effect is a consequence of the polarity of the medium, and the “enforced hydrophobic interactions”, generating a packing of the diene and dienophilic groups. Hydrogen bond interactions also contribute to this acceleration. What is more significant in this case, however, is the role of solvent and temperature in the resulting ratio of the two stereoisomers, although here are some conflicting data as well [43].

In 1952 Kwart reported that, in the reaction of maleimide with furan, regardless of the solvent used (water or ether), at 25°C the *endo*-isomer is favored, but at 90°C the *exo*-adduct is formed [45]. The use of high temperatures allows dissociation and recombination of the adduct, leading to the formation of the thermodynamically stable (*exo*) adduct, at the expense of the kinetically favored isomer (Scheme 1) [46]. At the same time, reports are indicating that water and other strongly polar solvents cause a loss in the aromaticity of furan, causing the reaction to be thermodynamically controlled (*exo*-adduct formation) [47]. In the specific case of the reaction of furfural with maleimide derivatives in water (60°C), *exo*-adducts are preferably formed in all cases [48].

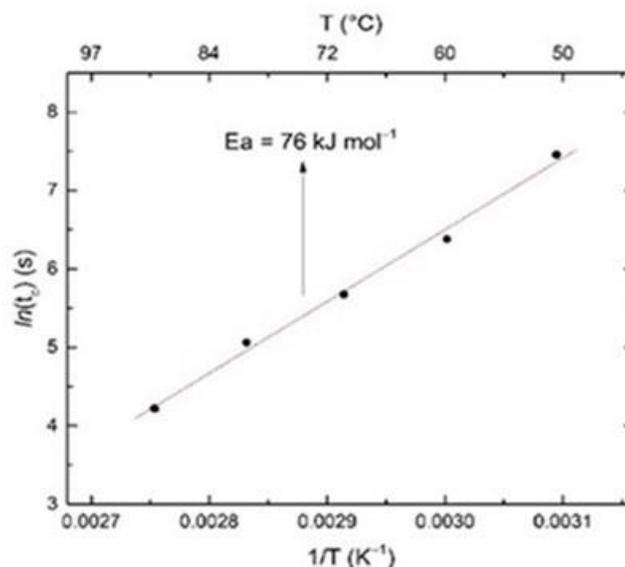


Figure 3. Arrhenius plot of the logarithm of the gelation time vs. reaction temperature according to Equation (5). Hydrogels formed between *N*-furfuryl chitosan (1% *w/w*) and PEG(mal)₂-7500 with $R = 0.25$. All experimental parameters as specified in Figure 2.

At the same time, recent kinetic studies on the stereochemistry of the furan/maleimide DA reaction reveal that the *endo*-isomer has a lower activation energy value than the *exo*-isomer [49–51].

On the one hand, a higher value of activation energy would suggest that, under our experimental conditions, the *exo*-adduct is being formed preferentially. Nevertheless, the effect of diffusion constraints on the mobility of the polymer chains during the progressive crosslinking, cannot be ruled out either [52]. The former suggests the formation of *exo*-isomers, while the latter would explain why a reaction with higher activation energy—requiring more thermal activation—is favored if it is kinetically disfavored [53,54].

3.3. Viscoelastic Characterization of the Hydrogels Obtained at Different Temperatures

A general outlook of the viscoelastic properties of the hydrogels prepared at temperatures between 50 and 90 °C appears in Figure 4 (regardless of the gelation temperature, all mechanical spectra were recorded at 25 °C for comparison purposes). At first glance, it should be noted that, by varying the temperature of the Diels–Alder reaction, hydrogels with good mechanical properties are obtained. The storage modulus is independent of the frequency and shows values between 200 and 500 Pa. The loss modulus, on the other hand, exhibits values two orders of magnitude lower than G' , except for the material formed at 90 °C, which is the weakest of the series.

As was already outlined in Figure 1 and Table 2, the elastic modulus follows a tendency to diminish as the gelation temperature increases. This effect does not seem to be an experimental artifact, nor a consequence of the retro-Diels–Alder reaction. The latter should be ruled out as the kinetics of the process does not shed light on the existence of this reaction under the employed experimental conditions.

This behavior seems to be a consequence of the reaction kinetics itself because as the crosslinking between the polymer chains takes place faster, the mobility of the polymer segments freezes earlier, and the possibilities of reaction between complementary functional groups become scarcer. This phenomenon is also evident from the very rapid evolution of the storage modulus at 90 °C, compared to that observed at 50 °C (Figure 1). Therefore, the lower the crosslinking density, the weaker the elastic response of the material should be.

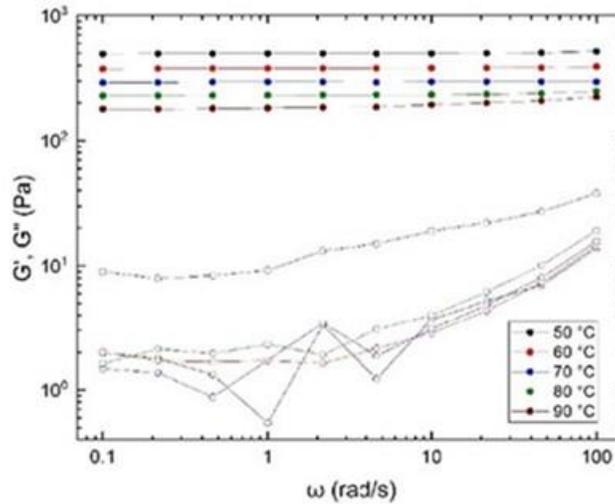


Figure 4. Frequency sweeps of the system of *N*-furfuryl chitosan 1 wt.% (21% degree of substitution) in 2% acetic acid and PEG(mal)₂-7500 with $R = 0.25$ prepared at 50, 60, 70, 80, and 90 °C, as indicated in the figure. All the measurements were conducted at 25 °C and $\gamma = 2.5\%$. G' , closed symbols, and G'' , open symbols.

To validate this hypothesis, the crosslinking density and the network mesh-size of these hydrogels were calculated. For this purpose, if we assume that the frequency sweeps were carried out under linear viscoelastic conditions—and it is reasonable given the experimental conditions used—then it is possible to estimate the crosslinking density from the basic concepts of Flory’s theory of elasticity. Then, the crosslinking density, ρ_x , was evaluated by the following equations [55]:

$$\rho_x = \frac{G'}{RT} \quad (6)$$

while the network average mesh-size, ξ_{av} , becomes:

$$\xi_{av} = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi\rho_x N_a}} \quad (7)$$

where R , T , and N_a are the universal gas constant, the absolute temperature, and the Avogadro Number, respectively.

From the average values of the equilibrium storage moduli shown in Figure 4, the crosslinking density and network mesh-sizes values were estimated and presented in Table 3.

Table 3. Values of crosslinking density, ρ_x , and network mesh-size values, ξ_{av} , of the hydrogels, calculated from Equations (6) and (7), respectively. All experimental parameters as specified in Figure 4.

T_{gel} (°C)	G' (Pa)	ρ_x (mol·cm ⁻³)	ξ_{av} (nm)
50	499.8	2.02×10^{-7}	25
60	380.5	1.53×10^{-7}	27
70	294.7	1.19×10^{-7}	30
80	233.7	0.94×10^{-7}	32
90	191.9	0.77×10^{-7}	34

Indeed, the values of the crosslinking density from Table 3 confirm that this parameter decreases as the reaction temperature increases. At high temperatures, crosslinking is rapid, which “freezes” the segmental motions of the chains, thus preventing a closer approach

between functional groups. Consequently, a lower reaction completion and slightly weaker mechanical properties were observed. In other words, the crosslinking density and the elastic properties of the hydrogel seem to be controlled by the diffusion of the polymer segments, rather than by the kinetics of the Diels–Alder reaction. The possible influence of the reverse reaction at higher temperatures once the gel is maintained at these temperatures after the gel point cannot be ruled out either.

3.4. Influence of Other Experimental Parameters: Concentration of Chitosan, Maleimide to Furan Molar Ratio, and Characteristics of the Maleimide Crosslinker

After analyzing the influence of reaction temperature, some other important experimental parameters were considered as well. Figure 5 summarizes the mechanical spectra registered at 25 °C, of hydrogels prepared at 70 °C, varying the following parameters: (i) polymer concentration: 1.0 and 1.8 wt.%; (ii) maleimide to furan molar ratio: 0.25 and 0.5; and (iii) characteristics of the maleimide crosslinker: degree of polymerization and functionality (as specified in Table 1). From a first general analysis of their mechanical spectra, it is evident that in all cases (except for the hydrogels prepared with a concentration of FCh 1% and PEG(mal)₂-2000), the storage modulus presents values greater than 200 Pa, reaching a limit of 2000 Pa.

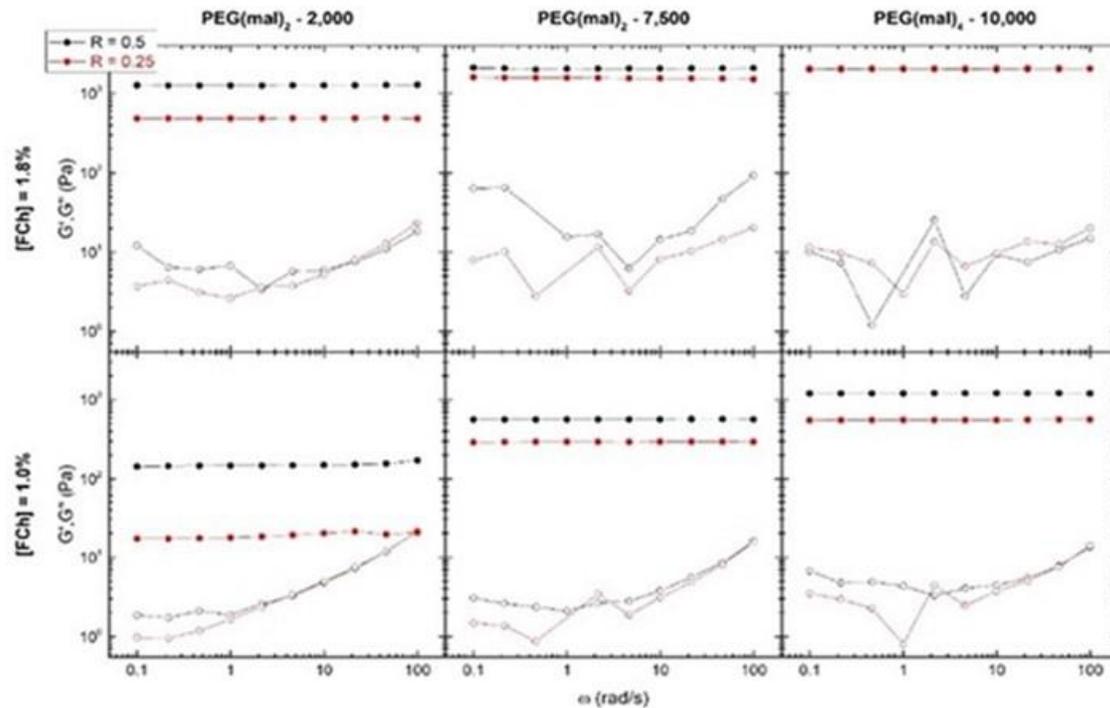


Figure 5. Mechanical spectra of *N*-furfuryl chitosan hydrogels based on the Diels–Alder click reaction varying the degree of polymerization and functionality of the PEG-maleimide compound, as indicated in the figure. Frequency sweeps were performed at 25 °C and $\gamma = 2.5\%$, after gelation at 70 °C. *N*-furfuryl chitosan (21% degree of substitution) dissolved in 2% acetic acid. Polymer concentration: 1.0 and 1.8 wt.%, and $R = 0.25$ (red) and 0.5 (black), as indicated in the figure. G' , closed symbols, and G'' , open symbols.

Following the same calculation procedure as for the hydrogels prepared at different temperatures, the crosslinking density was also calculated using Equation (6), and the results obtained are summarized in Table 4.

Table 4. Values of crosslinking density, ρ_x , calculated from Equation (6) for hydrogels based on the Diels–Alder click reaction at different degrees of polymerization and functionalities of the PEG-maleimide compound. To keep the visual association with the curves in Figure 5, the black and red colors are maintained.

[FCs] (wt.%)	R	PEG(mal) ₂ -2000	PEG(mal) ₂ -7500	PEG(mal) ₄ -10,000
		Crosslinking Density (mol/cm ³)		
1.8	0.5	5.09×10^{-7}	8.33×10^{-7}	8.17×10^{-7}
	0.25	1.97×10^{-7}	6.28×10^{-7}	8.34×10^{-7}
1.0	0.5	0.61×10^{-7}	2.28×10^{-7}	4.84×10^{-7}
	0.25	0.07×10^{-7}	1.19×10^{-7}	2.24×10^{-7}

* All experimental parameters as specified in Figure 5.

As expected, by increasing the concentration of chitosan there is a reinforcement of the mechanical properties, regardless of the value of R employed. The same happens when comparing the maleimide:furan molar ratio, at equal chitosan concentrations. In both cases, an increase in the concentration of any of the two functional groups is accompanied by a higher crosslinking density (Table 4). A similar effect has been reported during the chemical crosslinking of furan/maleimide system with hyaluronic acid, and semidiluted solutions of poly(vinyl alcohol) [8,56].

The role played by the degree of polymerization of polyethylene glycol on the hydrogel characteristics is interesting. For bifunctional maleimide derivatives, it is evident that an increase in chain length (DP: 45 vs. 170) has a noticeable effect on the gel. It can be speculated that due to their remarkable hydrophilicity and chain flexibility, PEGs have a significant impact on reaction completion by allowing better diffusion of maleimide groups in the reaction medium. This effect is more important at low concentrations of chitosan, whose chains are notably more rigid.

The effect of the functionality of the maleimide crosslinker deserves separate mention. As expected, the introduction of a tetrafunctional PEG-maleimide derivative leads to an increase in the storage modulus, accompanied by a higher crosslinking density.

3.5. Influence of the Temperature on the Mechanical Properties of a Diels–Alder Hydrogel

The effect of the temperature on the mechanical properties of a Diels–Alder crosslinked hydrogel was also investigated. For this purpose, a hydrogel was prepared with *N*-furfuryl chitosan 1.0 wt.% and PEG(mal)₂-7500, R = 0.5 at 70 °C. Once the hydrogel was formed, after 5 h of reaction, the temperature was lowered to 25 °C, and a frequency sweep was recorded after 15 min of equilibration. Then, the temperature was successively raised to 37, 50, 60, 70, 80, and 90 °C, and a mechanical spectrum registered after equilibration at the corresponding temperature for 15 min. The results of the thermorheological behavior of the hydrogel are displayed in Figure 6 (the dependence of the storage modulus with angular frequency is magnified inside the figure).

In the inset of Figure 6, a slight variation in the G' values is observed as the temperature of the hydrogel increases. To obtain a clear view about the dependence of this parameter on temperature, the average values of the equilibrium storage modulus were plotted on an Arrhenius-type plot, which are shown in Figure 7.

In Figure 7 it is interesting to note a strengthening of the elastic characteristics of the hydrogel as it is heated from 25 to 70 °C, resulting in a strong linear Arrhenius-type dependence. The origin of this behavior is not clear, but it could be due to an increase in the completeness of the Diels–Alder reaction. It should be noted that an Arrhenius-like behavior is the overall result of interactions between macromolecules and conformational changes, which inevitably leads to the dissociation and reformation of the crosslinks. The latter reflects the behavior of a system with dynamic crosslinking bonds, as in the case of the Diels–Alder and retro-Diels–Alder reactions [57]. In other words, the hydrogel crosslinked

by Diels–Alder cycloadducts is capable of self-completion, increasing the storage modulus (from 330 to 470 Pa) and the crosslinking density (from 1.3 to 1.5×10^{-7} mol/cm³).

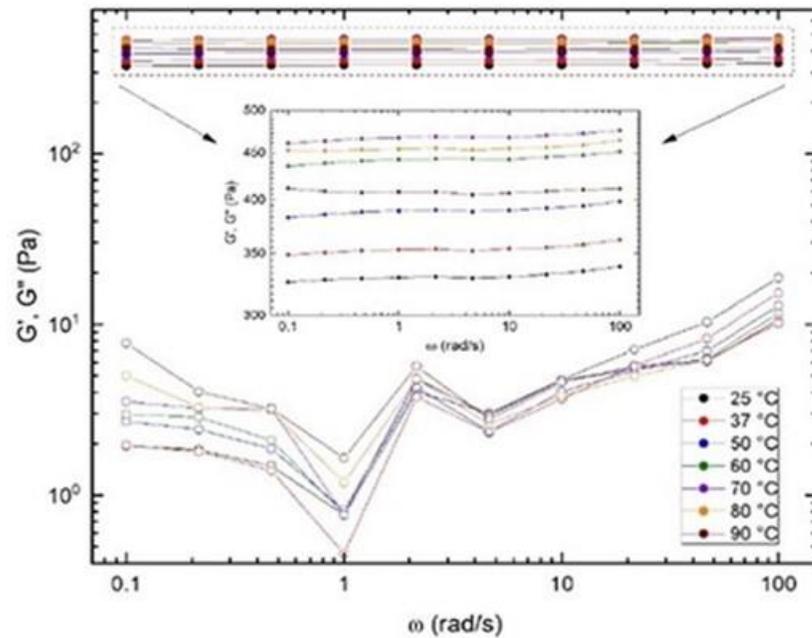


Figure 6. Mechanical spectra of *N*-furfuryl chitosan hydrogels based on the Diels–Alder click reaction after gelation at 70 °C. Frequency sweeps were performed at 25, 37, 50, 60, 70, 80, and 90 °C as indicated in the figure. The dependence of the storage modulus with angular frequency is magnified inside the figure. *N*-furfuryl chitosan 1-wt.% (21% degree of substitution) in 2% acetic acid, PEG(mal)₂-7500, $R = 0.25$, and $\gamma = 2.5\%$. G' , closed symbols, and G'' , open symbols.

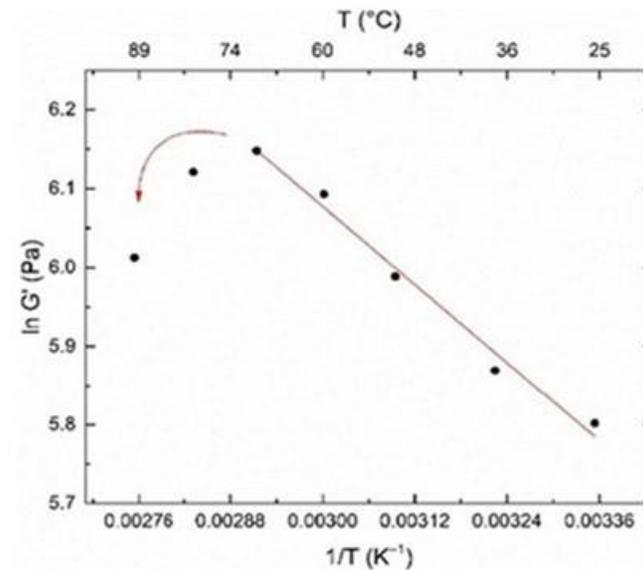


Figure 7. Arrhenius plot of the logarithm of the storage modulus vs. temperature. All experimental parameters as specified in Figure 6.

At temperatures above 70 °C, there is a drop in G' values. This deviation from the Arrhenius-like behavior unequivocally indicates that there is a process opposing to the Diels–Alder reaction, most likely the retro-Diels–Alder. Both the Diels–Alder and retro-Diels–Alder reactions proceed at different rates and their equilibrium is strongly influenced by temperature [37]. The hydrogel—which is already crosslinked—can reach an equilibrium between the direct and inverse reactions. That is, the dynamic character of this reaction allows certain rearrangement of the crosslinks within the hydrogel to take place. As a consequence, at temperatures below 80 °C the formation of the cycloadduct is likely to be favored, whereas above 80 °C, the breakdown of the adducts becomes increasingly important.

It should be mentioned that the actual difference in the values of the storage modulus during the heating of the hydrogel from 25 to 90 °C is very small (330–467 Pa), and therefore the variation in the degree of crosslinking is not large, as it would be expected for such a dynamic rearrangement of the polymer network.

These dynamic features of the Diels–Alder equilibrium underlie the self-healing and remendability behavior of these hydrogels. They represent a challenging and rapidly developing scientific frontier in polymeric materials science.

4. Conclusions

Clear and transparent hydrogels with excellent mechanical properties were prepared between *N*-furfuryl chitosan and PEG-maleimide derivatives in dilute aqueous acidic conditions. Applying the Winter and Chambon criterion, the gel times were estimated at different temperatures, and the activation energy was calculated to be 76 kJ·mol⁻¹. This value suggests that, under our experimental conditions, the *exo*-adduct is being formed preferentially.

The elastic modulus of the hydrogels prepared at temperatures between 50 and 90 °C follows a tendency to diminish as the gelation temperature increases. At high temperatures, crosslinking is rapid, which “freezes” the segmental motions of the chains; thus, preventing a closer approach between functional groups and the possibilities of reaction between complementary functional groups become scarce. The possible influence of the reverse reaction at higher temperatures once the gel is maintained at these temperatures after the gel point cannot be ruled out either.

The role played by the degree of polymerization of the crosslinking PEG-maleimide derivatives on the hydrogel mechanical properties is interesting. For bifunctional maleimide derivatives, it is evident that an increase in chain length of PEG has a noticeable effect on the strength of the gel. It can be hypothesized that, due to their remarkable hydrophilicity and chain flexibility, PEGs chains display an important effect on reaction completion by allowing a better diffusion of the maleimide groups in the reaction medium. This effect is more important at low concentrations of chitosan, whose chains are notably more rigid.

Once obtained, the hydrogel showed an improvement in its mechanical properties as the temperature increases up to 70 °C. Above this temperature, a decrease in the storage modulus is observed, indicating the existence of a process opposite to the Diels–Alder reaction, most likely the retro-Diels–Alder.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym14061202/s1>, Scheme S1: Synthesis of FCs; Figure S1: FT-IR spectra of chitosan and FCs; Figure S2: ¹H-NMR spectrum of FCs; Figure S3: FTIR spectra of the *N*-furfuryl chitosan, PEG-bismaleimide, and the Diels–Alder cycloadduct; Figure S4: Dynamic mechanical spectra at 25 °C of the precursor solution, and that of the corresponding hydrogel prepared at 50 °C; Figure S5: Storage and loss moduli as a function of the reaction time of the gelation process.

Author Contributions: Conceptualization, W.A.-M.; methodology, C.R.-P. and L.S.-G.; validation, W.A.-M., J.L.-M., Y.L.-F. and C.P.-C.; formal analysis, W.A.-M.; investigation, C.R.-P. and L.S.-G.; resources, L.S.-G.; data curation, C.R.-P. and L.S.-G.; writing—original draft preparation, C.R.-P. and W.A.-M.; writing—review and editing, W.A.-M., J.L.-M., Y.L.-F. and C.P.-C.; visualization, W.A.-M. and C.R.-P.; supervision, W.A.-M.; project administration, L.S.-G.; funding acquisition, W.A.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: CRP acknowledges CONACyT for her scholarship for Ph.D. studies (492318). The authors are grateful to Refugio Pérez-González from the Spectroscopy Laboratory of the Department of Polymers and Materials, the University of Sonora for providing the ¹H-NMR spectra.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Kumirska, J.; Weinhold, M.X.; Thöming, J.; Stepnowski, P. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers* **2011**, *3*, 1875–1901. [CrossRef]
- Kim, S. Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities. *Int. J. Polym. Sci.* **2018**, *2018*, 1708172. [CrossRef]
- Argüelles-Monal, W.; Goycoolea, F.M.; Peniche, C.; Higuera-Ciajara, I. Rheological Study of the Chitosan/Glutaraldehyde Chemical Gel System. *Polym. Gels Netw.* **1998**, *6*, 429–440. [CrossRef]
- Moura, M.J.; Figueiredo, M.M.; Gil, M.H. Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3823–3829. [CrossRef]
- Espinosa-García, B.M.; Argüelles-Monal, W.M.; Hernández, J.; Félix-Valenzuela, L.; Acosta, N.; Goycoolea, F.M. Molecularly Imprinted Chitosan–Genipin Hydrogels with Recognition Capacity toward O-Xylene. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3355–3364. [CrossRef] [PubMed]
- Montiel-Herrera, M.; Gandini, A.; Goycoolea, F.M.; Jacobsen, N.E.; Lizardi-Mendoza, J.; Recillas-Mota, M.; Argüelles-Monal, W.M. N-(Furfural) Chitosan Hydrogels Based on Diels–Alder Cycloadditions and Application as Microspheres for Controlled Drug Release. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *128*, 220–227. [CrossRef] [PubMed]
- Montiel-Herrera, M.; Gandini, A.; Goycoolea, F.M.; Jacobsen, N.E.; Lizardi-Mendoza, J.; Recillas-Mota, M.T.; Argüelles-Monal, W.M. Furan–Chitosan Hydrogels Based on Click Chemistry. *Iran. Polym. J.* **2015**, *24*, 349–357. [CrossRef]
- Nimmo, C.M.; Owen, S.C.; Shoichet, M.S. Diels–Alder Click Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 824–830. [CrossRef]
- Guaresti, O.; García-Astrain, C.; Palomares, T.; Alonso-Varona, A.; Eceiza, A.; Gabilondo, N. Synthesis and Characterization of a Biocompatible Chitosan–Based Hydrogel Cross-Linked via ‘Click’ Chemistry for Controlled Drug Release. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 1–9. [CrossRef]
- Papadimitriou, S.A.; Achilias, D.S.; Bikiaris, D.N. Chitosan-g-PEG Nanoparticles Ionically Crosslinked with Poly(Glutamic Acid) and Tripolyphosphate as Protein Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* **2012**, *430*, 318–327. [CrossRef]
- Natesan, S.; Pandian, S.; Ponnusamy, C.; Palanichamy, R.; Muthusamy, S.; Kandasamy, R. Co-Encapsulated Resveratrol and Quercetin in Chitosan and Peg Modified Chitosan Nanoparticles: For Efficient Intra Ocular Pressure Reduction. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 1837–1845. [CrossRef]
- Casettari, L.; Vlasaliu, D.; Castagnino, E.; Stolnik, S.; Howdle, S.; Illum, L. PEGylated Chitosan Derivatives: Synthesis, Characterizations and Pharmaceutical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 659–685. [CrossRef]
- Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021. [CrossRef]
- Lahann, J. (Ed.) *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2009.
- Han, J.; Wang, X.; Liu, L.; Li, D.; Suyaola, S.; Wang, T.; Baigude, H. “Click” Chemistry Mediated Construction of Cationic Curdlan Nanocarriers for Efficient Gene Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *163*, 191–198. [CrossRef]
- Evans, D.A.; Johnson, J.S. Diels–Alder Reactions. In *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; Jacobsen, E.N., Pfaltz, A., Yamamoto, H., Eds.; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 1999; Volume III, pp. 1177–1235.
- Gandini, A.; Lacerda, T.M. From Monomers to Polymers from Renewable Resources: Recent Advances. *Prog. Polym. Sci.* **2015**, *48*, 1–39. [CrossRef]
- Gandini, A. The Application of the Diels–Alder Reaction to Polymer Syntheses Based on Furan/Maleimide Reversible Couplings. *Polimeros Cienc. Tecnol.* **2005**, *15*, 95–101. [CrossRef]

19. Gandini, A. The Furan/Maleimide Diels–Alder Reaction: A Versatile Click–Unclick Tool in Macromolecular Synthesis. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1–29. [CrossRef]
20. Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, 3rd ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, UK, 2001.
21. Orozco, F.; Niyazov, Z.; Garnier, T.; Migliore, N.; Zdvizhkov, A.T.; Raffa, P.; Moreno-Villoslada, I.; Picchioni, F.; Bose, R.K. Maleimide Self-Reaction in Furan/Maleimide-Based Reversibly Crosslinked Polyketones: Processing Limitation or Potential Advantage? *Molecules* **2021**, *26*, 2230. [CrossRef]
22. Liu, X.; Du, P.; Liu, L.; Zheng, Z.; Wang, X.; Joncheray, T.; Zhang, Y. Kinetic Study of Diels–Alder Reaction Involving in Maleimide–Furan Compounds and Linear Polyurethane. *Polym. Bull.* **2013**, *70*, 2319–2335. [CrossRef]
23. Goussé, C.; Gandini, A. Diels–Alder Polymerization of Difurans with Bismaleimides. *Polym. Int.* **1999**, *48*, 723–731. [CrossRef]
24. Garcia-Astrain, C.; Gandini, A.; Coelho, D.; Mondragon, I.; Retegi, A.; Eceiza, A.; Corcuera, M.A.; Gabilondo, N. Green Chemistry for the Synthesis of Methacrylate-Based Hydrogels Crosslinked through Diels–Alder Reaction. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 3998–4007. [CrossRef]
25. Tung, C.-Y.M.; Dynes, P.J. Relationship between Viscoelastic Properties and Gelation in Thermosetting Systems. *J. Appl. Polym. Sci.* **1982**, *27*, 569–574. [CrossRef]
26. Winter, H.H.; Chambon, F. Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point. *J. Rheol.* **1986**, *30*, 367–382. [CrossRef]
27. Chambon, F.; Winter, H.H. Linear Viscoelasticity at the Gel Point of a Crosslinking PDMS with Imbalanced Stoichiometry. *J. Rheol.* **1987**, *31*, 683–697. [CrossRef]
28. Holly, E.E.; Venkataraman, S.K.; Chambon, F.; Winter, H.H. Fourier Transform Mechanical Spectroscopy of Viscoelastic Materials with Transient Structure. *J. Non-Newton. Fluid Mech.* **1988**, *27*, 17–26. [CrossRef]
29. Winter, H.H. Evolution of rheology during chemical gelation. In *Permanent and Transient Networks; Progress in Colloid and Polymer Science*; Steinkopff: Darmstadt, Germany, 1987; Volume 75, pp. 104–110.
30. Winter, H.H.; Mours, M. Rheology of Polymers near Liquid–Solid Transitions. *Adv. Polym. Sci.* **1997**, *134*, 165–234.
31. Winter, H.H. Can the Gel Point of a Cross-Linking Polymer Be Detected by the G' – G'' Crossover? *Polym. Eng. Sci.* **1987**, *27*, 1698–1702. [CrossRef]
32. Gough, L.J.; Smith, I.T. A Gel Point Method for the Estimation of Overall Apparent Activation Energies of Polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **1960**, *3*, 362–364. [CrossRef]
33. Ross-Murphy, S.B. Reversible and Irreversible Biopolymer Gels—Structure and Mechanical Properties. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 1534–1539. [CrossRef]
34. Nnyigide, O.S.; Hyun, K. The Rheological Properties and Gelation Kinetics of Corn Starch/Bovine Serum Albumin Blend. *Korea-Aust. Rheol. J.* **2020**, *32*, 71–78. [CrossRef]
35. Dewar, M.J.S.; Pierini, A.B. Mechanism of the Diels–Alder Reaction. Studies of the Addition of Maleic Anhydride to Furan and Methylfurans. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 203–208. [CrossRef]
36. Liu, Y.-L.; Hsieh, C.-Y.; Chen, Y.-W. Thermally Reversible Cross-Linked Polyamides and Thermo-Responsive Gels by Means of Diels–Alder Reaction. *Polymer* **2006**, *47*, 2581–2586. [CrossRef]
37. Gandini, A.; Coelho, D.; Silvestre, A.J.D. Reversible Click Chemistry at the Service of Macromolecular Materials. Part 1: Kinetics of the Diels–Alder Reaction Applied to Furan–Maleimide Model Compounds and Linear Polymerizations. *Eur. Polym. J.* **2008**, *44*, 4029–4036. [CrossRef]
38. Tian, Q.; Rong, M.Z.; Zhang, M.Q.; Yuan, Y.C. Synthesis and Characterization of Epoxy with Improved Thermal Remendability Based on Diels–Alder Reaction. *Polym. Int.* **2010**, *59*, 1339–1345. [CrossRef]
39. Park, J.S.; Yun, D.H.; Ko, T.W.; Park, Y.S.; Woo, J.W. Kinetic Study of the Diels–Alder Reaction of Cyclopentadiene with Bis(2-Ethylhexyl) Maleate. *Adv. Mater. Res.* **2013**, *634–638*, 541–545.
40. Liu, S.; Liu, X.; He, Z.; Liu, L.; Niu, H. Thermoreversible Cross-Linking of Ethylene/Propylene Copolymers Based on Diels–Alder Chemistry: The Cross-Linking Reaction Kinetics. *Polym. Chem.* **2020**, *11*, 5851–5860. [CrossRef]
41. Liu, Y.-L.; Hsieh, C.-Y. Crosslinked Epoxy Materials Exhibiting Thermal Remendability and Removability from Multifunctional Maleimide and Furan Compounds. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2006**, *44*, 905–913. [CrossRef]
42. Engberts, J.B.F.N. Diels–Alder Reactions in Water: Enforced Hydrophobic Interaction and Hydrogen Bonding. *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 823–828. [CrossRef]
43. Fringuelli, F.; Taticchi, A. Diels–Alder Reaction in Unconventional Reaction Media. In *The Diels–Alder Reaction*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2001; pp. 251–300.
44. Graziano, G. Rate Enhancement of Diels–Alder Reactions in Aqueous Solutions. *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, *17*, 100–101. [CrossRef]
45. Kwart, H.; Burchuk, I. Isomerism and Adduct Stability in the Diels–Alder Reaction. 1a I. The Adducts of Furan and Maleimide. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3094–3097. [CrossRef]
46. Martin, J.G.; Hill, R.K. Stereochemistry of the Diels–Alder Reaction. *Chem. Rev.* **1961**, *61*, 537–562. [CrossRef]
47. Rulišek, L.; Šebek, P.; Havlas, Z.; Hrabal, R.; Čapek, P.; Svatoš, A. An Experimental and Theoretical Study of Stereoselectivity of Furan–Maleic Anhydride and Furan–Maleimide Diels–Alder Reactions. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6295–6302. [CrossRef]
48. Cioc, R.C.; Lutz, M.; Pidko, E.A.; Crockatt, M.; van der Waal, J.C.; Bruijninx, P.C.A. Direct Diels–Alder Reactions of Furfural Derivatives with Maleimides. *Green Chem.* **2021**, *23*, 367–373. [CrossRef]

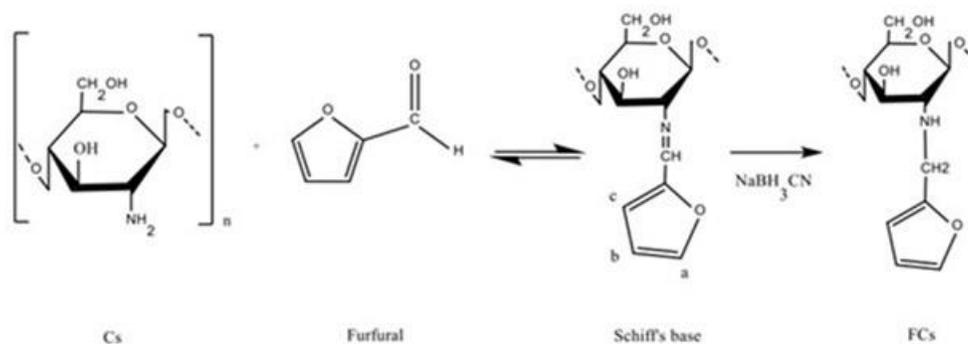
49. Buonerba, A.; Lapenta, R.; Ortega Sánchez, S.; Capacchione, C.; Milione, S.; Grassi, A. A Comprehensive Depiction of the Furan-Maleimide Coupling via Kinetic and Thermodynamic Investigations of the Diels-Alder Reaction of Poly(Styrene-co-2-Vinylfuran) with Maleimides. *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 1605–1612. [CrossRef]
50. Cuvellier, A.; Verhelle, R.; Brancart, J.; Vanderborght, B.; Assche, G.V.; Rahier, H. The Influence of Stereochemistry on the Reactivity of the Diels-Alder Cycloaddition and the Implications for Reversible Network Polymerization. *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 473–485. [CrossRef]
51. Mangialetto, J.; Verhelle, R.; Van Assche, G.; Van den Brande, N.; Van Mele, B. Time-Temperature-Transformation, Temperature-Conversion-Transformation, and Continuous-Heating-Transformation Diagrams of Reversible Covalent Polymer Networks. *Macromolecules* **2021**, *54*, 412–425. [CrossRef]
52. Defize, T.; Thomassin, J.-M.; Alexandre, M.; Gilbert, B.; Riva, R.; Jérôme, C. Comprehensive Study of the Thermo-Reversibility of Diels-Alder Based PCL Polymer Networks. *Polymer* **2016**, *84*, 234–242. [CrossRef]
53. Guigo, N.; Sbirrazzuoli, N.; Vyazovkin, S. Gelation on Heating of Supercooled Gelatin Solutions. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 698–702. [CrossRef]
54. Chen, K.; Baker, A.N.; Vyazovkin, S. Concentration Effect on Temperature Dependence of Gelation Rate in Aqueous Solutions of Methylcellulose. *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 211–216. [CrossRef]
55. Pescosolido, L.; Feruglio, L.; Farra, R.; Fiorentino, S.; Colombo, I.; Coviello, T.; Matricardi, P.; Hennink, W.E.; Vermonden, T.; Grassi, M. Mesh Size Distribution Determination of Interpenetrating Polymer Network Hydrogels. *Soft Matter* **2012**, *8*, 7708–7715. [CrossRef]
56. Kjøniksen, A.-L.; Nyström, B. Effects of Polymer Concentration and Cross-Linking Density on Rheology of Chemically Cross-Linked Poly(Vinyl Alcohol) near the Gelation Threshold. *Macromolecules* **1996**, *29*, 5215–5222. [CrossRef]
57. Elling, B.R.; Dichtel, W.R. Reprocessable Cross-Linked Polymer Networks: Are Associative Exchange Mechanisms Desirable? *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 1488–1496. [CrossRef] [PubMed]

Article

Chitosan Hydrogels Based on the Diels–Alder Click Reaction: Rheological and Kinetic Study

Cintha Ruiz-Pardo ¹, Luisa Silva-Gutiérrez ¹, Jaime Lizardi-Mendoza ¹, Yolanda López-Franco ¹, Carlos Peniche-Covas ² and Waldo Argüelles-Monal ^{1,*}

- ¹ Grupo de Investigación en Biopolímeros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo 83304, Sonora, Mexico; cintha.ruiz@estudiantes.ciad.mx (C.R.-P.); lsilva@ciad.mx (L.S.-G.); jalim@ciad.mx (J.L.-M.); lopezf@ciad.mx (Y.L.-F.); waldo@ciad.mx (W.A.-M.)
² Facultad de Química, Universidad de la Habana, Vedado 10400, La Habana, Cuba; cpeniche2015@yahoo.com
 * Correspondence: waldo@ciad.mx



Scheme S 1. Synthesis of *N*-furfuryl chitosan.

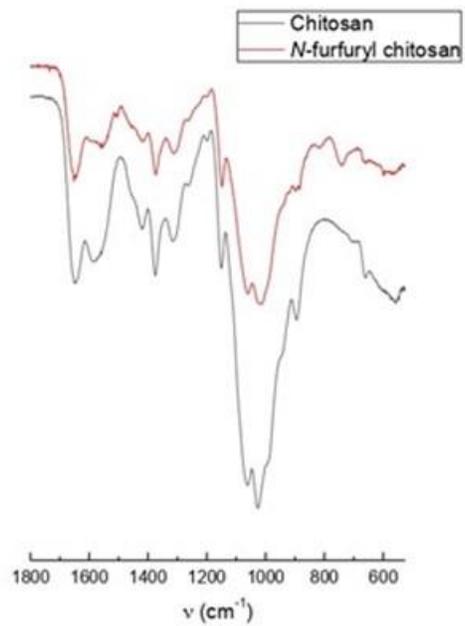


Figure S1. FT-IR spectra of chitosan and *N*-furfuryl chitosan.

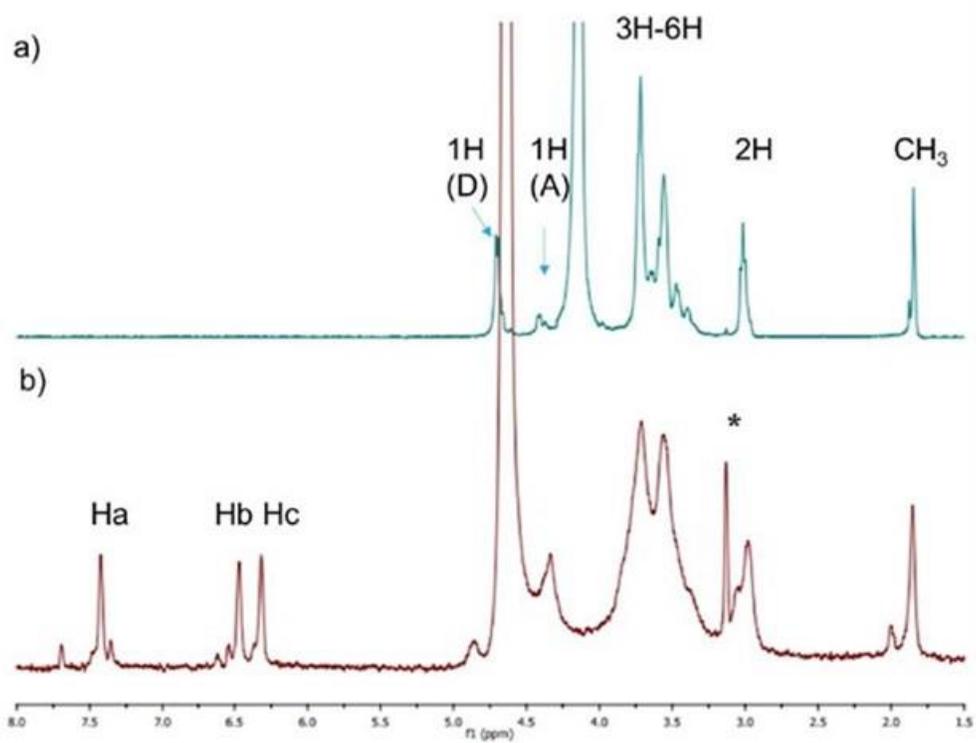


Figure S2. ¹H NMR spectra of (a) chitosan and (b) *N*-furfuryl chitosan.

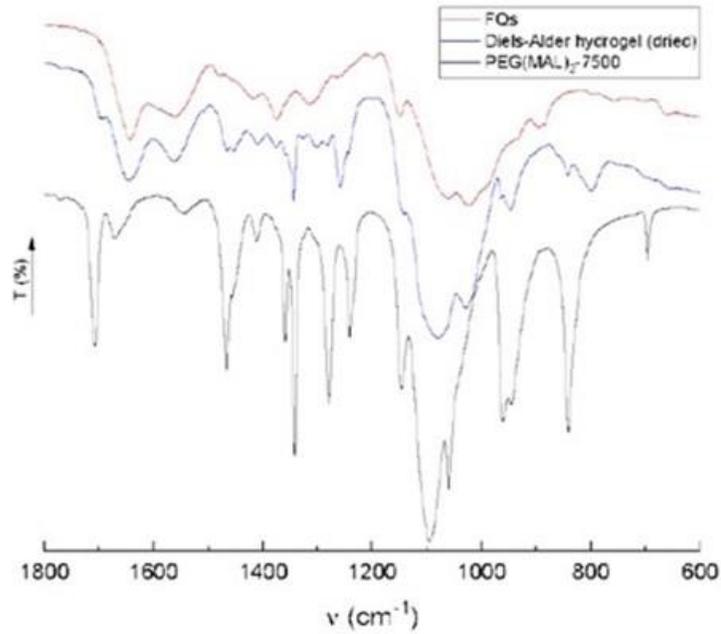


Figure S3. FTIR spectra of the *N*-furfuryl chitosan, PEG-bismaleimide and Diels–Alder cycloadduct.

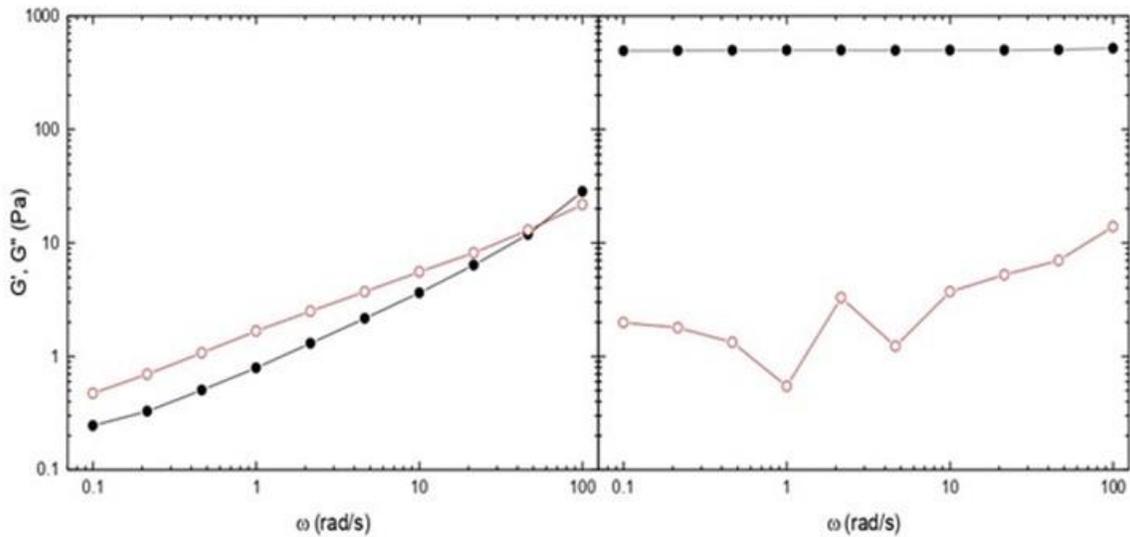


Figure S4. Mechanical spectra at 25 °C of the system of *N*-(furfuryl)-chitosan (1 %-w/w) and PEG(mal)₂-7500 with R = 0.25 in 2% acetic acid a) before gelation and b) after gelation at 50 °C. *G'*, closed symbols, and *G''*, open symbols.

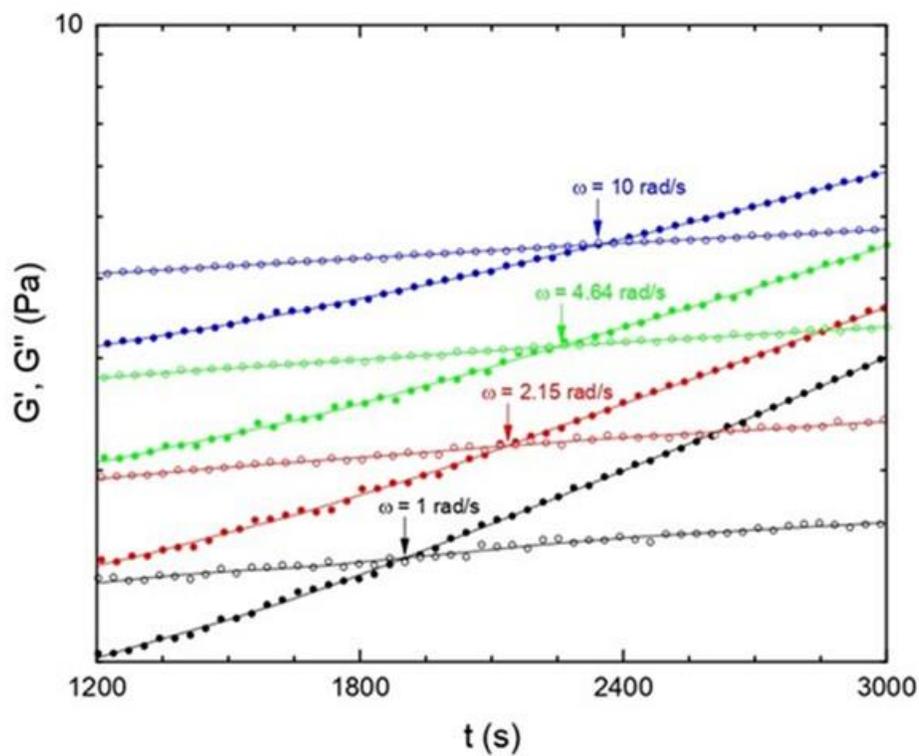


Figure S5. Storage and loss moduli as a function of the reaction time of the gelation process at 50 °C. *N*-furfuryl chitosan (21% degree of substitution) and PEG(mal) 2-7500 dissolved in 2% acetic acid. Curves at different frequencies as marked in the graph. The frequency-dependence of moduli crossover point is obvious. Polymer concentration: 1 wt.%, $R = 0.25$.

3. DIELS–ALDER CROSSLINKED HYDROGELS: IS RHEOLOGY A SUITABLE METHOD TO STUDY THE SELF-HEALING PROCESS?

Cinthy Ruiz-Pardo¹, Luisa Silva-Gutiérrez¹, Jaime Lizardi-Mendoza¹, Yolanda López-Franco¹, Carlos Peniche-Covas² and Waldo Argüelles-Monal^{1,*}

¹ Grupo de Investigación en Biopolímeros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo 83304, Sonora, Mexico; cinthya.ruiz@estudiantes.ciad.mx (C.R.-P.); lsilva@ciad.mx (L.S.-G.); jalim@ciad.mx (J.L.-M.); lopezf@ciad.mx (Y.L.-F.)

² Facultad de Química, Universidad de la Habana, Vedado 10400, La Habana, Cuba
cpeniche2015@yahoo.com

* Correspondence: waldo@ciad.mx

Enviado 31 de mayo 2022 a la revista ACS Macro Letters

Diels–Alder crosslinked hydrogels: Is rheology a suitable method to study the self-healing process?

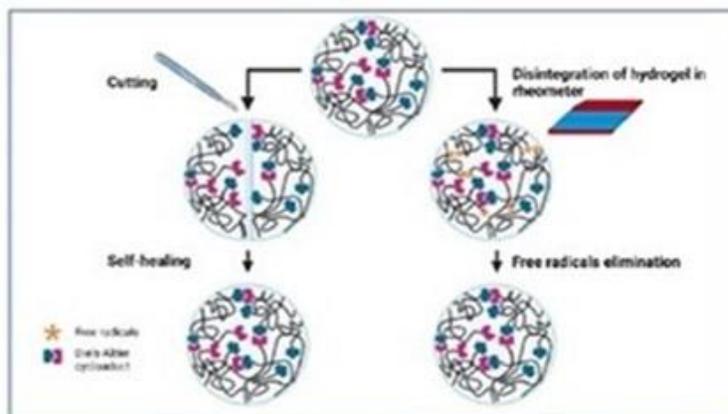
Cynthia Ruiz-Pardo¹, Luisa Silva-Gutiérrez¹, Jaime Lizardi-Mendoza¹, Yolanda López-Franco¹, Carlos Peniche-Covas² and Waldo Argüelles-Monal^{1,*}

¹ Grupo de Investigación en Biopolímeros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo 83304, Sonora, Mexico; cynthia.ruiz@estudiantes.ciad.mx (C.R.-P.); lsilva@ciad.mx (L.S.-G.); jalim@ciad.mx (J.L.-M.); lopezf@ciad.mx (Y.L.-F.)

² Facultad de Química, Universidad de la Habana, Vedado 10400, La Habana, Cuba
cpeniche2015@yahoo.com

* Correspondence: waldo@ciad.mx

Abstract: The suitability of rheology to study the self-healing process of an *N*-furfuryl chitosan/polyethylene glycol-bismaleimide hydrogel based on the Diels–Alder reaction is analyzed. Applying shear stresses above the yield point results in a general disintegration of the hydrogel with storage modulus values below the loss modulus. Upon restoring a small strain—



within the linear viscoelastic zone—an instantaneous recovery of the solid-elastic properties is appreciated. This contrasts with the very long times observed visually or by optical microscopy for self-healing of the material. Thus, the rheological response is not the result of the dynamic character of the Diels–Alder bonds, but due to the formation of free radicals when submitting polymer chains to a strong shear strain, which would certainly explain the instantaneous recovery. Therefore, the use of rheology for the study of self-healing of at least chemically cross-linked hydrogels is neither appropriate nor adequate.

Keywords: rheology; self-healing; dynamic-covalent reactions; Diels–Alder reaction; chitosan; PEG–bismaleimide; furan

Self-healing refers to the process by which a material can heal itself to a physical damage, spontaneously and easily restoring the original structure and properties of polymeric materials. This is achieved by re-establishing new covalent and non-covalent bonds between the pieces. This process enables the opportunity to prolong the lifespan of the polymeric materials without the need for alternative restoration procedures as long as it diminishes the time and cost expenses.¹ Self-healing recovery can occur spontaneously or by the application of a stimulus (radiation, heat, water). At the molecular level, physical or chemical events are recognized to be involved to achieve self-healing. Among physical events, there are diffusion and shape memory effects. In contrast, chemical processes include supramolecular interactions and dynamic covalent bonds.²

It is worth noting that Wool and O'Connor, when proposing a general mechanism of the self-curing process, recognize the importance of certain physical conditions in order for the self-curing process of polymers to take place. Namely: *i*) structural reorganization of the damaged surface; *ii*) wettability; *iii*) reptation and *iv*) randomization of the chains and/or formation of chemical interactions.³ There are determining factors in the efficiency of self-healing such as time, which influences the reptation of the polymer chains; molecular mass and, mobility, which improve the efficiency of self-healing.⁴

Diels-Alder (DA) reaction is a click-chemistry reversible covalent reaction that takes place within a diene and dienophile as furan and maleimide derivatives.⁵ This kind of reaction produces highly stable and stereospecific structures with multiple dynamic covalent bonds at temperatures below 90 °C and in many cases reversible up to 100 °C.⁶ The multiple σ -bonds from the cycloadducts formed by means of these reactions are more prone to be broken since there are weaker than other carbon-carbon single bonds. Therefore, during physical damage, those broken bonds can be restored due to the dynamic behavior of the DA bonds.⁷

In recent years, several studies have been reported on the preparation of crosslinked *N*-furfuryl chitosan hydrogels by Diels–Alder reaction with maleimide derivatives.^{8–11} These materials present advantages for biomedical and biotechnological applications. The Diels–Alder reaction is recognized by its equilibrium with the retro-Diels–Alder reaction. However, their reaction rates depend differently on the reaction temperature. Recently, our group has reported a kinetic and rheological investigation about the formation of these hydrogels using *N*-furfuryl chitosan and PEG-maleimide derivatives with different degrees of polymerization and functionality, as a result, clear and transparent hydrogels with good mechanical properties were obtained.¹¹ On the other hand, the specific characteristics of this type of click chemistry reaction, together with its reversible and dynamic character, enable these hydrogels to be self-healing.

In this article, the self-healing behavior of the Diels–Alder hydrogels between *N*-furfuryl chitosan and PEG-maleimide derivatives is analyzed in aqueous media. Rheology is, along with visual observation and microscopy, the main technique commonly used to study the self-healing process and its efficacy. In this paper, the suitability of rheology to investigate self-healing is examined.

Unless otherwise indicated, a hydrogel was prepared between *N*-furfuryl chitosan and polyethylene glycol-bismaleimide at 80 °C for 5 hours. Figure S1 shows the evolution of the storage and loss moduli, during the preparation of the hydrogel. This behavior is consistent with that reported previously, in which it is evident how the storage modulus grows as the polymer

crosslinking proceeds.¹¹ The mechanical spectrum of the hydrogel formed, using a strain of 2.5%, confirms that it is indeed a material with good mechanical properties (Fig. S2).

Before evaluating the self-healing process, the rheological response of the hydrogel was analyzed by varying the deformation amplitude (Figure 1). As can be seen, below $\gamma = 30\%$ is the SAOS (small amplitude oscillatory strain) zone in which the requirements of linear viscoelasticity are met. After the intermediate zone, in which the hydrogel begins to be broken, the LAOS (large amplitude oscillatory strain) zone appears, for strain values greater than 300%. It is also evident the crossing point of the storage and loss moduli ($\gamma = 400\%$), which marks the yield point of this hydrogel. Above the yield point, we are in the zone of non-linear viscoelasticity, and the physical damage to the hydrogel is considerable. On this basis, a value of $\gamma = 800\%$ was selected for the study of the self-healing process.

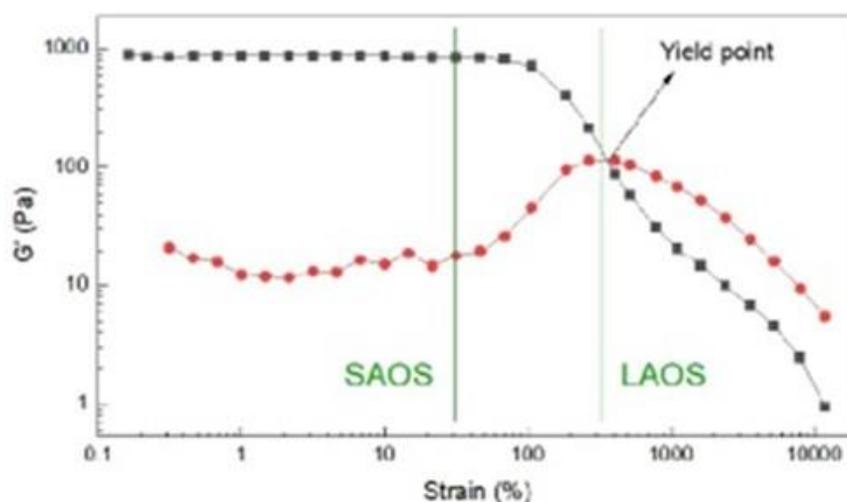


Figure 1. Strain amplitude sweep ($\gamma = 0.1 - 1000\%$) of the hydrogel using $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$.

Based on this information, the self-healing behavior of these hydrogels was examined by means of rheology, using $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$, alternating the shear strain values during 3 cycles between 2.5 % (for 5 minutes) and 800 % (2 minutes), as illustrated in Fig. 2. Initially G' and G'' show the expected values, according to the behavior shown in Fig. S1. Then, when applying a shear strain greater than the yield point, this behavior disappears, and G'' is greater than G' . That should not be interpreted that the material "flows", but rather that the hydrogel has disintegrated into many small pieces and, probably, these small fragments "slip" into each other, giving the perception of a plastic flow, which is not possible due to the chemical nature of the Diels–Alder crosslinking. This two-minute mechanical breakdown of the material is followed by an apparent rapid restoration of the viscoelastic properties of the hydrogel, with very little loss in the values of both viscoelastic moduli. This behavior was repeated during the three cycles tested. The hydrogel displayed the same behavior, at all the temperatures investigated, in terms of the almost instantaneous recovery once the shear stress ceases.

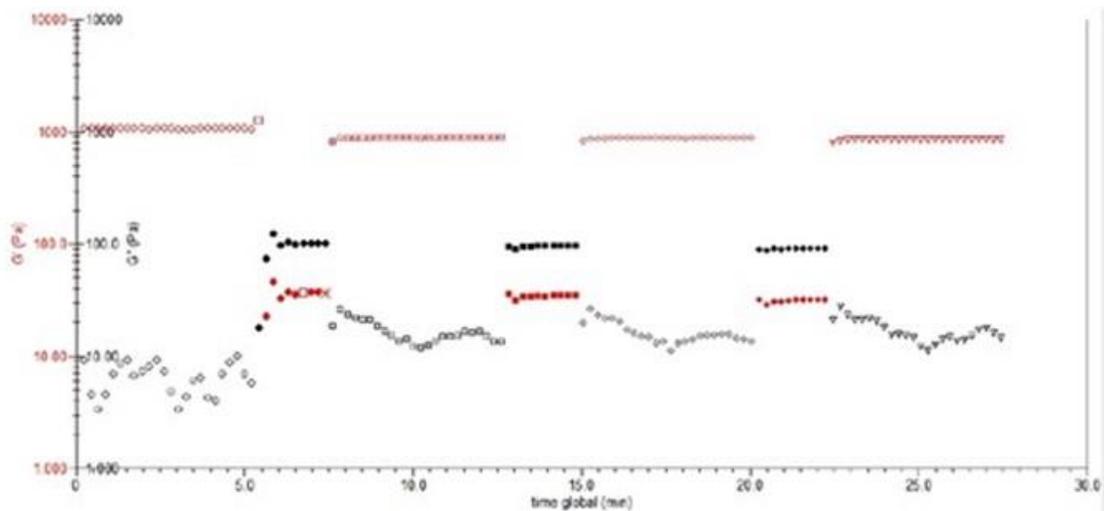


Figure 2. Rheological behavior of the hydrogel using $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$, alternating the shear strain values during 3 cycles between 2.5 % (for 5 minutes) and 800 % (2 minutes).

This process was repeated, with different hydrogels at different temperatures between 30 and 80 °C, but all prepared under the same conditions at 80 °C, for 5 hours. The storage modulus values were used to quantitatively estimate the efficiency of the self-healing process after each non-linear deformation cycle, with respect to its value before breakage, and expressed as a percent. In all cases, a very similar pattern to that shown in Figure 2 was observed. Figure 3 summarizes the values of the percentage of self-healing recovery obtained for each cycle at the temperatures analyzed.

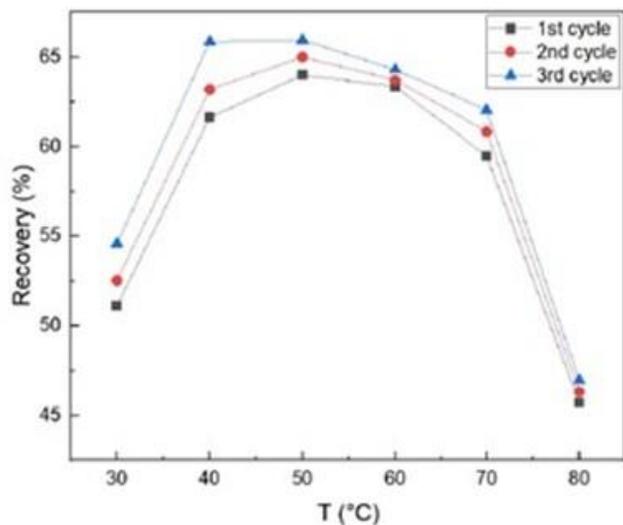


Figure 3. Dependence of the percentage of recovery on the value of the storage module during three cycles, as described in Fig. 2. Independent experiments carried out at different temperatures between 30 and 80 °C

It is noticeable that there is a marked dependence of the recovery on the temperature for each cycle. This may be a consequence of the relationship between the rate of the Diels–Alder, and

retro-Diels–Alder reactions with temperature, and the resulting degree of cross-linking. Moreover, at all the temperatures analyzed, a very small increase in the recovery of the elastic modulus is observed with each new breakdown-recovery cycle.

At 50 °C the maximum recovery in the viscoelastic properties of the hydrogel is observed, so this temperature was selected to study the self-healing performance related to the degree of polymerization of the crosslinker and its functionality. In general, the monitoring of G' and G'' curves during the breakdown-recovery cycles were very similar to the pattern found in Figure 2, concerning the instantaneous recovery of the viscoelastic moduli and the magnitude of the recovery percentage. A summary of the results obtained for each of the three crosslinkers and the degree of *N*-furfurylation of chitosan is presented in Figure 4. It can be noticed that there is an inverse relationship between the decrease in the value of G' during fracture and its recovery upon cessation of the shear stress.

Overall, it can be concluded that regardless of the polymer/crosslinker system, rheological experiments suggest a very fast—almost instantaneous—mechanical recovery of the hydrogel.

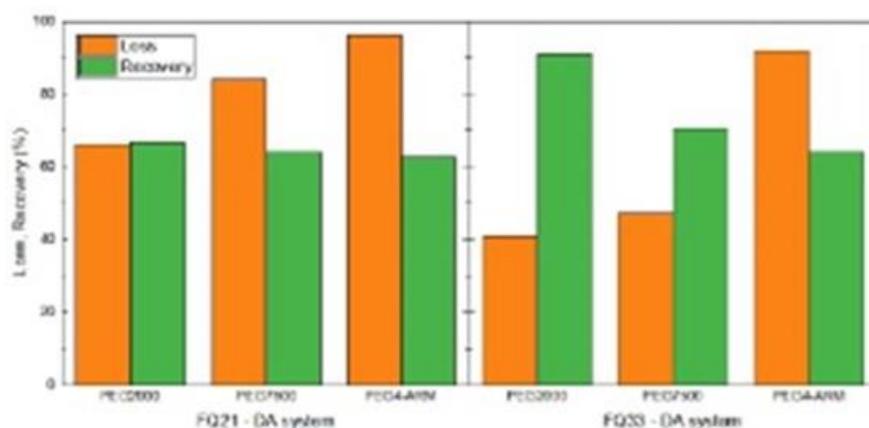


Figure 4. Summary of the percent loss values and recovery of G' values, during the first shear deformation cycle, at 50 °C, with hydrogels obtained with two *N*-furfuryl chitosan samples and three PEG-maleimide derivatives.

The rheological studies were also complemented with a visual analysis of the self-healing process. A photographic sequence of the tests performed with two diametrically cut cylindrical hydrogels, one of which was stained to visualize the self-healing process is shown in Figure 5. At first glance, it is striking that, in contrast to the rheological results, the time frame in which the self-recovery process takes place is much longer. At a temperature of 20 °C in a water vapor-saturated environment, the healing takes about 24-36 hours. Two videos of these experiments, confirming these results, are also available as supplementary material.

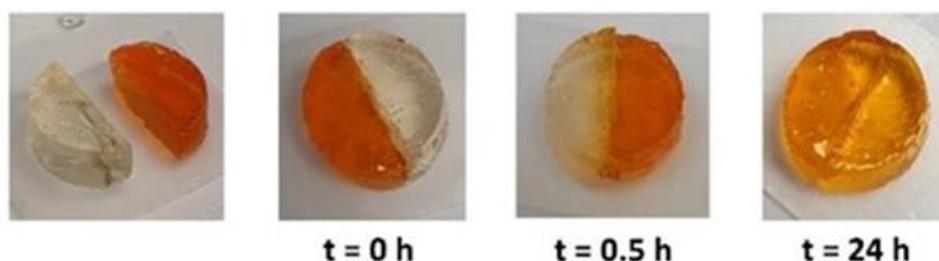


Figure 5. Photographic sequence of the tests performed with two diametrically cut cylindrical hydrogels, one of which was stained to visualize the self-healing process.

To get certainty about these results, observations by optical microscopy were also carried out (Figure 6). From the sequence of optical micrographs, it can be perceived how the healing process of a cut made in the hydrogel takes place for more than 24 hours.

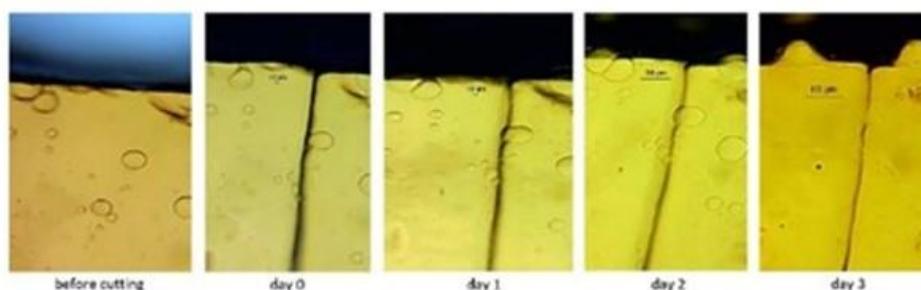


Figure 6. Optical micrograph sequence of the tests performed with two diametrically cut cylindrical hydrogels prepared as described in Fig. 5.

The apparent inconsistency between the results shown by rheology and those performed by visual analysis and by optical microscopy of the evolution of cuttings applied to hydrogels requires to be explained. On the one hand, both methodologies are widely employed nowadays for studies of injectable, and self-healing hydrogels in general. Rheology is an extensively reported technique in investigations of self-healing with chemically cross-linked hydrogels, both with Diels–Alder linkages as well as with other types of dynamic chemical bonds.^{12–17}

From our perspective, the incoherence is due to the different types of fracture generated by the application of strong shear stress in hydrogels by rheology. It is well-known that polymeric materials subjected to a large shear strain cannot compensate the applied shearing stress by a spatial rearrangement of the long polymer chains especially when they are cross-linked by covalent bonds.^{18–20} As a result, the polymer network is more prone to break. In these cases, homolytic cleavage of the macromolecular chains occurs at the points of highest tension, which leads to the formation of free radicals.^{21–25} This scenario should be expected to be the case within the thin hydrogel layer subjected to a very strong shear within the plates of the rheometer. This is particularly valid when employing cross-hatched geometries allowing a strong grip of the hydrogel to the rheometer plates, avoiding stress dissipation by slipping.

If this appreciation of the characteristics of the rupture inside the rheometer is accurate, the formation of free radicals—with their high reactivity and short lifetimes—would certainly explain the instantaneous recovery during self-healing. In other words, the behavior observed in the self-healing process of hydrogels by dynamic rheology is not the result of recovery due to the dynamic character of the Diels–Alder bonds, but to the formation of free radicals. The latter are then responsible for the re-crosslinking of the material by termination reactions with other free radicals present through the volume of the hydrogel crumbled by strong shear stress.

It could be concluded that the dynamic rheology by alternating SAOS/LAOS cycles is neither an adequate nor a suitable technique to evaluate the self-healing phenomenon when the hydrogel is crosslinked by dynamic chemical bonding, —Diels–Alder among them—. Consequently, the use of rheology for the study of recovery in self-healing hydrogels is not appropriate, especially for chemically crosslinked hydrogels.

References

- (1) Olaitan Ayeleru, O.; Apata Olubambi, P. Concept of Self-Healing in Polymeric Materials. *Materials Today: Proceedings* **2022**. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.811>.
- (2) Zhang, F.; Ju, P.; Pan, M.; Zhang, D.; Huang, Y.; Li, G.; Li, X. Self-Healing Mechanisms in Smart Protective Coatings: A Review. *Corrosion Science* **2018**, *144*, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2018.08.005>.
- (3) Wool, R. P.; O'Connor, K. M. A Theory Crack Healing in Polymers. *Journal of Applied Physics* **1981**, *52* (10), 5953–5963. <https://doi.org/10.1063/1.328526>.
- (4) Wool, R. P. Self-Healing Materials: A Review. *Soft Matter* **2008**, *4* (3), 400–418. <https://doi.org/10.1039/B711716G>.
- (5) Gandini, A. The Furan/Maleimide Diels–Alder Reaction: A Versatile Click–Unclick Tool in Macromolecular Synthesis. *Progress in Polymer Science* **2013**, *38* (1), 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.04.002>.
- (6) Gyarmati, B.; Szilágyi, B. Á.; Szilágyi, A. Reversible Interactions in Self-Healing and Shape Memory Hydrogels. *European Polymer Journal* **2017**, *93*, 642–669. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.05.020>.
- (7) Ehrhardt, D.; Van Durme, K.; Jansen, J. F. G. A.; Van Mele, B.; Van den Brande, N. Self-Healing UV-Curable Polymer Network with Reversible Diels–Alder Bonds for Applications in Ambient Conditions. *Polymer* **2020**, *203*, 122762. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122762>.
- (8) Nimmo, C. M.; Owen, S. C.; Shoichet, M. S. Diels–Alder Click Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (3), 824–830. <https://doi.org/10.1021/bm101446k>.
- (9) Montiel-Herrera, M.; Gandini, A.; Goycoolea, F. M.; Jacobsen, N. E.; Lizardi-Mendoza, J.; Recillas-Mota, M.; Argüelles-Monal, W. M. N-(Furfural) Chitosan Hydrogels Based on Diels–Alder Cycloadditions and Application as Microspheres for Controlled Drug Release. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *128*, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.052>.
- (10) Guaresti, O.; García-Astrain, C.; Palomares, T.; Alonso-Varona, A.; Eceiza, A.; Gabilondo, N. Synthesis and Characterization of a Biocompatible Chitosan–Based Hydrogel Cross-Linked via ‘Click’ Chemistry for Controlled Drug Release. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *102*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.003>.

- (11) Ruiz-Pardo, C.; Silva-Gutiérrez, L.; Lizardi-Mendoza, J.; López-Franco, Y.; Peniche-Covas, C.; Argüelles-Monal, W. Chitosan Hydrogels Based on the Diels–Alder Click Reaction: Rheological and Kinetic Study. *Polymers* **2022**, *14* (6), 1202. <https://doi.org/10.3390/polym14061202>.
- (12) Yang, B.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Tao, L.; Li, S.; Wei, Y. Facilely Prepared Inexpensive and Biocompatible Self-Healing Hydrogel: A New Injectable Cell Therapy Carrier. *Polym. Chem.* **2012**, *3* (12), 3235–3238. <https://doi.org/10.1039/C2PY20627G>.
- (13) Wei, Z.; Yang, J. H.; Du, X. J.; Xu, F.; Zrinyi, M.; Osada, Y.; Li, F.; Chen, Y. M. Dextran-Based Self-Healing Hydrogels Formed by Reversible Diels–Alder Reaction under Physiological Conditions. *Macromolecular Rapid Communications* **2013**, *34* (18), 1464–1470. <https://doi.org/10.1002/marc.201300494>.
- (14) Terech, P.; Yan, M.; Maréchal, M.; Royal, G.; Galvez, J.; Velu, S. K. P. Characterization of Strain Recovery and “Self-Healing” in a Self-Assembled Metallo-Gel. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (19), 7338–7344. <https://doi.org/10.1039/C3CP50671A>.
- (15) Bose, R. K.; Kötteritzsch, J.; Garcia, S. J.; Hager, M. D.; Schubert, U. S.; Zwaag, S. van der. A Rheological and Spectroscopic Study on the Kinetics of Self-Healing in a Single-Component Diels–Alder Copolymer and Its Underlying Chemical Reaction. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2014**, *52* (12), 1669–1675. <https://doi.org/10.1002/pola.27164>.
- (16) Qu, J.; Zhao, X.; Ma, P. X.; Guo, B. PH-Responsive Self-Healing Injectable Hydrogel Based on N-Carboxyethyl Chitosan for Hepatocellular Carcinoma Therapy. *Acta Biomaterialia* **2017**, *58*, 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.001>.
- (17) Liu, Y.; Wong, C.-W.; Chang, S.-W.; Hsu, S. An Injectable, Self-Healing Phenol-Functionalized Chitosan Hydrogel with Fast Gelling Property and Visible Light-Crosslinking Capability for 3D Printing. *Acta Biomaterialia* **2021**, *122*, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.12.051>.
- (18) Bestul, A. B. Evidence for Mechanical Shear Degradation of High Polymers. *J. Phys. Chem.* **1957**, *61* (4), 418–421. <https://doi.org/10.1021/j150550a009>.
- (19) Booth, C. The Mechanical Degradation of Polymers. *Polymer* **1963**, *4*, 471–478. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(63\)90060-0](https://doi.org/10.1016/0032-3861(63)90060-0).
- (20) Sim, H. G.; Khomami, B.; Sureshkumar, R. Flow-Induced Chain Scission in Dilute Polymer Solutions: Algorithm Development and Results for Scission Dynamics in Elongational Flow. *Journal of Rheology* **2007**, *51* (6), 1223–1251. <https://doi.org/10.1122/1.2789945>.
- (21) Larsen, H. A.; Drickamer, H. G. Mechanical Degradation and Cross Linking of Polymers by Plastic Deformation at High Pressure. *J. Phys. Chem.* **1957**, *61* (12), 1643–1646. <https://doi.org/10.1021/j150558a019>.
- (22) Alexander, P.; Fox, M. The Role of Free Radicals in the Degradation of High Polymers by Ultrasonics and by High-Speed Stirring. *Journal of Polymer Science* **1954**, *12* (1), 533–541. <https://doi.org/10.1002/pol.1954.120120145>.
- (23) Sakaguchi, M.; Sohma, J. ESR Evidence for Main-Chain Scission Produced by Mechanical Fracture of Polymers at Low Temperature. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **1975**, *13* (6), 1233–1245. <https://doi.org/10.1002/pol.1975.180130614>.
- (24) Fanconi, B. M.; DeVries, K. L.; Smith, R. H. Free Radicals and New End Groups Resulting from Chain Scission: 2. Mechanical Degradation of Polyethylene. *Polymer* **1982**, *23* (7), 1027–1033. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(82\)90403-7](https://doi.org/10.1016/0032-3861(82)90403-7).
- (25) Zhurkov, S. N.; Zakrevskiy, V. A.; Korsukov, V. E.; Kuksenko, V. S. Mechanism of Submicrocrack Generation in Stressed Polymers. *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics* **1972**, *10* (8), 1509–1520. <https://doi.org/10.1002/pol.1972.160100808>.

Supplementary Information

Diels–Alder crosslinked hydrogels: Is rheology a suitable method to study the self-healing process?

Cinthya Ruiz-Pardo ¹, Luisa Silva-Gutiérrez ¹, Jaime Lizardi-Mendoza ¹, Yolanda López-Franco ¹, Carlos Peniche-Covas ² and Waldo Argüelles-Monal ^{1,*}

¹ Grupo de Investigación en Biopolímeros, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo 83304, Sonora, Mexico; cinthya.ruiz@estudiantes.ciad.mx (C.R.-P.); lsilva@ciad.mx (L.S.-G.); jalim@ciad.mx (J.L.-M.); lopezf@ciad.mx (Y.L.-F.)

² Facultad de Química, Universidad de la Habana, Vedado 10400, La Habana, Cuba
cpeniche2015@yahoo.com

* Correspondence: waldo@ciad.mx

1. Experimental part

1.1 Materials

Chitosan with a degree of acetylation of 18% and weight-average molecular weight of 200 kDa was provided by Primex ehf (Iceland). Low polydispersity linear polyethylene glycol bismaleimide derivatives were acquired from JenKem Technology, TX, USA. The characteristics of these PEG-maleimide derivatives are presented in Table S1.

Table S1. Identification and characteristics of the PEG-maleimide derivatives.

Identification	<i>f</i> ¹	Substitution ² (%)	Molecular weight (polydispersity) ³	Purity ⁴ (%)
PEG(mal) ₂ -2000	2	97.9	2,084 (1.04)	99.2
PEG(mal) ₂ -7500	2	98.1	7,408 (1.03)	100
PEG(mal) ₄ -10000	4	94.7	10,160 (1.04)	98.0

¹ *f*: functionality

² Determined by ¹H NMR, reported by the supplier

³ Molecular weights (polydispersity) by MALDI GPC, reported by the supplier

⁴ Determined by HPLC, reported by the supplier

All other reagents were purchased from Sigma Aldrich. Deionized Type I ultrapure water with a conductivity lower than 0.05 μS cm⁻¹ was used in all experiments.

1.2 Synthesis of N-furfuryl-chitosan (FCs)

The synthesis of N-furfuryl chitosan was carried out as described previously with modifications.¹ Briefly, 2.58 g chitosan (12.17 -NH₂ mmol) was dissolved in 1000 mL of 2% aqueous acetic acid overnight. Next, 433 μ L of furfural (5.23 mmol) was dropped under stirring into the Cs solution at room temperature and allowed to react for 4 h at pH 5. Then, 16 mL of a freshly prepared aqueous solution containing 0.987 g of NaH₃BCN was slowly added with the aid of a peristaltic pump (Minipuls 3, Gilson, France), and the reaction was further conducted for 3 h. After the completion of the process, the chitosan derivative was precipitated with 1 M NH₄OH until a pH~7–8 was attained, and successively washed with water until reaching a 0.5 μ S cm⁻¹ conductivity, water:ethanol mixtures 40:60, 20:80 (v:v) and ethanol. Finally, the purified sample was dried at room temperature under vacuum (yield: 83%).

1.3 Rheological studies

Dynamic viscoelastic measurements were carried out using an AR-G2 rheometer (TA Instruments, New Castle, DE, USA) equipped with a stainless-steel cross-hatched parallel plate geometry (diameter: 40 mm; gap: 400 μ m) and a Peltier system for temperature control.

A fresh FCs solution prepared the day before in acetic acid (2%) was mixed with the appropriate amount of the maleimide compound and stirred for a few minutes. The mole ratio of maleimide to furan groups, R, was chosen to be 0.25. Before loading the sample into the rheometer, it was centrifuged for 6 min at 15,000 \times g, to remove bubbles. A thin layer of low viscosity silicone oil was added around the periphery of the geometry plate to prevent the evaporation of the sample.

Once the sample was loaded, a thin layer of low viscosity silicone oil was added around the periphery of the geometry plate to prevent the evaporation of the sample. All experiments were performed isothermally, according to the following program: A mechanical spectrum was recorded at 25 °C within a frequency range between 0.1 and 100 rad·s⁻¹, followed by a rapid heating of the sample up to the gelation temperature at 80°C, typically in 45-50 s. The Diels–Alder reaction was then monitored isothermally during 5 hours by the variation of G' and G'' at four frequencies between 1 and 10 rad·s⁻¹. During these initial steps, a 2.5% strain was used thus ensuring that measurements were performed within the linear viscoelastic region and avoiding damages to the gel under formation.

A self-healing recovery test was then conducted isothermally, at temperatures between 30 and 80 °C, by means of rheology, using $\omega = 1$ rad s⁻¹, alternating the shear strain values during 3 cycles between 2.5 % (for 5 minutes) and 800 % (2 minutes).

(1) Montiel-Herrera, M.; Gandini, A.; Goycoolea, F. M.; Jacobsen, N. E.; Lizardi-Mendoza, J.; Recillas-Mota, M.; Argüelles-Monal, W. M. N-(Furfural) Chitosan Hydrogels Based on Diels–Alder Cycloadditions and Application as Microspheres for Controlled Drug Release. *Carbohydrate Polymers* 2015, 128, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.052>.

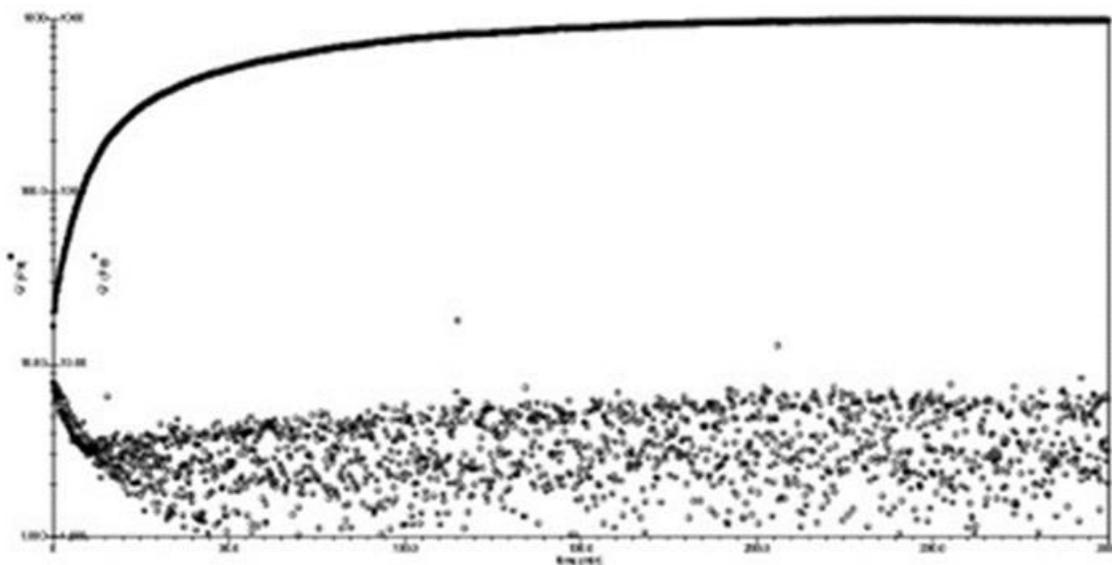


Figure S1. Evolution of storage modulus (G' , closed symbols), and loss modulus (G'' , open symbols). Traces for $\omega = 1, 2.15, 4.64,$ and 10 rad s^{-1} . $\gamma = 2.5\%$.

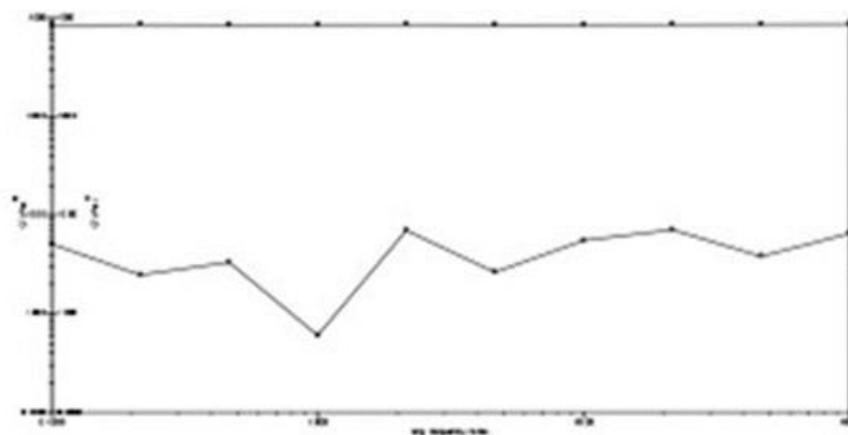


Figure S2. Frequency sweeps of the hydrogel prepared at $80 \text{ }^\circ\text{C}$. G' , closed symbols, and G'' , open symbols. $\gamma = 2.5\%$.

4. CONCLUSIONES

Se obtuvieron hidrogeles transparentes y con buenas propiedades mecánicas entre *N*-furfuril quitosana y PEG-(maleimida). Se aplicó el criterio de Winter y Chambon para estimar los tiempos críticos de gelificación para temperaturas de reacción entre 50 y 90 °C. Se obtuvieron valores de energía de reacción de 76 kJ mol⁻¹ lo que sugiere que, bajo nuestras condiciones experimentales, se favorece la formación del aducto *exo*. A medida que la temperatura de reacción aumenta, también lo hace la velocidad reacción. Sin embargo, los módulos elásticos de los hidrogeles obtenidos disminuyen con la temperatura de reacción. Lo anterior, se explica porque al incrementar la temperatura, el entrecruzamiento es más rápido, lo que provoca que los movimientos segmentales de las cadenas se “congelen”, disminuyendo las posibilidades de que los grupos funcionales puedan reaccionar. La reacción de retro-Diels-Alder no parece tener una influencia decisiva sobre la cinética de reacción antes o durante el punto crítico de gelificación.

Por su parte, un aumento del grado de polimerización de los derivados bifuncionales de PEG-maleimida incrementa notablemente la fortaleza del hidrogel. Debido a su notable hidrofilia y a la flexibilidad de estas cadenas, los derivados de PEGs presentan una mejor difusión de los grupos maleimida en el medio de reacción y por lo tanto se logra un mayor completamiento de la reacción de entrecruzamiento. Este efecto es más importante a bajas concentraciones de quitosana, cuyas cadenas son notablemente más rígidas.

Al aumentar la temperatura por debajo de 70 °C, los hidrogeles ya formados muestran una mejoría en sus propiedades mecánicas, mientras que por encima de esa temperatura hay una disminución del módulo de almacenamiento del hidrogel, lo que sugiere la presencia de la reacción de retro-Diels-Alder.

El proceso de auto-reparación de estos hidrogeles fue evaluado por reología dinámica. Al aplicar sucesivamente tres ciclos alternos de deformación con una tensión de cizalla con valores por encima y por debajo del punto de fluencia, se observó la desintegración mecánica del material, seguido de una recuperación instantánea. La aparente discrepancia en la escala de tiempo entre los experimentos reológicos y la auto-reparación macroscópica se debe interpretar como consecuencia de que, en reología, se produce la ruptura homolítica de las cadenas macromoleculares en los puntos de mayor tensión, lo que conduce a la formación de radicales libres. Al terminar esa tensión,

el hidrogel se recupera instantáneamente debido a la recombinación de los radicales libres. En este sentido, se concluye que, contrario a lo que profusamente se publica en la literatura, el uso de la reología dinámica para evaluar la auto-reparación de hidrogeles químicos carece de fundamento y no es apropiada para estudiar este proceso.

5. REFERENCIAS

- Adzima, B. J., Aguirre, H. A., Kloxin, C. J., Scott, T. F., & Bowman, C. N. (2008). Rheological and Chemical Analysis of Reverse Gelation in a Covalently Cross-Linked Diels–Alder Polymer Network. *Macromolecules*, *41*(23), 9112-9117. <https://doi.org/10.1021/ma801863d>
- Aguirresarobe, R. H., Nevejans, S., Reck, B., Irusta, L., Sardon, H., Asua, J. M., & Ballard, N. (2021). Healable and self-healing polyurethanes using dynamic chemistry. *Progress in Polymer Science*, *114*, 101362. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2021.101362>
- Ahmad, U., Sohail, M., Ahmad, M., Minhas, M. U., Khan, S., Hussain, Z., Kousar, M., Mohsin, S., Abbasi, M., Shah, S. A., & Rashid, H. (2019). Chitosan based thermosensitive injectable hydrogels for controlled delivery of loxoprofen: Development, characterization and in-vivo evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *129*, 233-245. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.031>
- Argüelles-Monal, W. M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Recillas-Mota, M. T., & Montiel-Herrera, M. (2018). Chitosan Derivatives: Introducing New Functionalities with a Controlled Molecular Architecture for Innovative Materials. *Polymers*, *10*(3), 342. <https://doi.org/10.3390/polym10030342>
- Bae, K. H., Moon, C. W., Lee, Y., & Park, T. G. (2009). Intracellular delivery of heparin complexed with chitosan-g-poly(ethylene glycol) for inducing apoptosis. *Pharmaceutical Research*, *26*(1), 93-100. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9713-1>
- Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., & Kumar, N. S. (2018). Comparative study on antimicrobial activity and biocompatibility of N-selective chitosan derivatives. *Reactive and Functional Polymers*, *124*, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.01.016>
- Blokzijl, W., Blandamer, M., & Engberts, J. (1991). Diels-Alder reactions in aqueous-solutions—Enforced hydrophobic interactions between diene and dienophile. *Journal of the American Chemical Society*, *113*(11), 4241-4246.
- Boger, D. L., & Weinreb, S. M. (2012). *Hetero Diels-Alder methodology in organic synthesis* (Vol. 47). Elsevier.
- Brasca, R., Kneeteman, M. N., Mancini, P. M. E., & Fabian, W. M. F. (2009). Theoretical explanation of the regioselectivity of polar cycloaddition reactions between furan derivatives and Danishefsky's diene. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, *911*(1), 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2009.07.008>
- Breslow, R., Maitra, U., & Rideout, D. (1983). Selective diels-alder reactions in aqueous solutions and suspensions. *Tetrahedron Letters*, *24*(18), 1901-1904. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)81801-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)81801-8)
- Casettari, L., Vllasaliu, D., Castagnino, E., Stolnik, S., Howdle, S., & Illum, L. (2012). PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Progress in Polymer Science*, *37*(5), 659-685. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.10.001>
- Casettari, L., Vllasaliu, D., Mantovani, G., Howdle, S. M., Stolnik, S., & Illum, L. (2010). Effect

- of PEGylation on the toxicity and permeability enhancement of chitosan. *Biomacromolecules*, *11*(11), 2854-2865. <https://doi.org/10.1021/bm100522c>
- Chambon, F., & Winter, H. H. (1985). Stopping of crosslinking reaction in a PDMS polymer at the gel point. *Polymer Bulletin*, *13*(6), 499-503. <https://doi.org/10.1007/BF00263470>
- Chambon, F., & Winter, H. H. (1987). Linear Viscoelasticity at the Gel Point of a Crosslinking PDMS with Imbalanced Stoichiometry. *Journal of Rheology*, *31*(8), 683-697. <https://doi.org/10.1122/1.549955>
- Cheah, W. Y., Show, P.-L., Ng, I.-S., Lin, G.-Y., Chiu, C.-Y., & Chang, Y.-K. (2019). Antibacterial activity of quaternized chitosan modified nanofiber membrane. *International Journal of Biological Macromolecules*, *126*, 569-577. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.193>
- Defize, T., Riva, R., Raquez, J.-M., Dubois, P., Jérôme, C., & Alexandre, M. (2011). Thermoreversibly crosslinked poly(ϵ -caprolactone) as recyclable shape-memory polymer network. *Macromolecular Rapid Communications*, *32*(16), 1264-1269. <https://doi.org/10.1002/marc.201100250>
- Diaz, M. M., Van Assche, G., Maurer, F. H. J., & Van Mele, B. (2017). Thermophysical characterization of a reversible dynamic polymer network based on kinetics and equilibrium of an amorphous furan-maleimide Diels-Alder cycloaddition. *Polymer*, *120*, 176-188. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.05.058>
- Diels, O., & Alder, K. (1928). Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie*, *460*(1), 98-122. <https://doi.org/10.1002/jlac.19284600106>
- Ding, X., Nguyen, S. T., Williams, J. D., & Peet, N. P. (2014). Diels–Alder reactions of five-membered heterocycles containing one heteroatom. *Tetrahedron Letters*, *55*(51), 7002-7006. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.10.114>
- Dobrowolski, M. A., Roszkowski, P., Struga, M., & Szulczyk, D. (2017). The unexpected product of Diels-Alder reaction between “indanocyclon” and maleimide. *Journal of Molecular Structure*, *1130*, 573-578. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.10.067>
- El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2018). Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *120*, 1181-1189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139>
- El Knidri, H., Dahmani, J., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A. (2019). Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*, *139*, 1092-1102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.079>
- Fernández-Quiroz, D., González-Gómez, Á., Lizardi-Mendoza, J., Vázquez-Lasa, B., Goycoolea, F. M., San Román, J., & Argüelles-Monal, W. M. (2015). Effect of the molecular architecture on the thermosensitive properties of chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam). *Carbohydrate Polymers*, *134*, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.069>
- Gandini, A. (2005). The application of the Diels-Alder reaction to polymer syntheses based on furan/maleimide reversible couplings. *Polímeros*, *15*(2), 95-101. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282005000200007>
- Gandini, A. (2013). The furan/maleimide Diels–Alder reaction: A versatile click–unclick tool in

- macromolecular synthesis. *Progress in Polymer Science*, 38(1), 1-29. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.04.002>
- Gandini, A., & Belgacem, M. N. (1997). Furans in polymer chemistry. *Progress in Polymer Science*, 22(6), 1203-1379. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(97\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(97)00004-X)
- Gandini, A., & Belgacem, M. N. (2008). Furan Derivatives and Furan Chemistry at the Service of Macromolecular Materials. En M. N. Belgacem & A. Gandini (Eds.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (pp. 115-152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00006-5>
- Gandini, A., Coelho, D., & Silvestre, A. J. D. (2008). Reversible click chemistry at the service of macromolecular materials. Part 1: Kinetics of the Diels–Alder reaction applied to furan–maleimide model compounds and linear polymerizations. *European Polymer Journal*, 44(12), 4029-4036. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.09.017> Kinetic aspects of the Diels–Alder reaction between poly(styrene-co-furfuryl methacrylate) and bismaleimide,”
- Gandini, A., & Lacerda, T. M. (2015). From monomers to polymers from renewable resources: Recent advances. *Progress in Polymer Science*, 48, 1-39. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.11.002>
- Ganji, F., & Abdekhodaie, M. J. (2008). Synthesis and characterization of a new thermosensitive chitosan–PEG diblock copolymer. *Carbohydrate Polymers*, 74(3), 435-441. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.03.017>
- García-Astrain, C., Gandini, A., Peña, C., Algar, I., Eceiza, A., Corcuera, M., & Gabilondo, N. (2014). Diels–Alder “click” chemistry for the cross-linking of furfuryl-gelatin-polyetheramine hydrogels. *RSC Advances*, 4(67), 35578-35587. <https://doi.org/10.1039/C4RA06122E>
- García-Astrain, C., González, K., Gurrea, T., Guaresti, O., Algar, I., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2016). Maleimide-grafted cellulose nanocrystals as cross-linkers for bionanocomposite hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 149, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.091>
- García-Astrain, C., Guaresti, O., González, K., Santamaria-Echart, A., Eceiza, A., Corcuera, M. A., & Gabilondo, N. (2016). Click gelatin hydrogels: Characterization and drug release behaviour. *Materials Letters*, 182, 134-137. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.06.115>
- Gheneim, R., Perez-Berumen, C., & Gandini, A. (2002). Diels–Alder Reactions with Novel Polymeric Dienes and Dienophiles: Synthesis of Reversibly Cross-Linked Elastomers. *Macromolecules*, 35(19), 7246-7253. <https://doi.org/10.1021/ma020343c>
- Goiti, E., Heatley, F., Huglin, M. B., & Rego, J. M. (2004). Kinetic aspects of the Diels–Alder reaction between poly(styrene-co-furfuryl methacrylate) and bismaleimide. *European Polymer Journal*, 40(7), 1451-1460. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.01.036>
- Gregoritz, M., & Brandl, F. P. (2015). The Diels–Alder reaction: A powerful tool for the design of drug delivery systems and biomaterials. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 438-453. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.007>
- Guaresti, O., García-Astrain, C., Aguirresarobe, R. H., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2018). Synthesis of stimuli-responsive chitosan-based hydrogels by Diels-Alder cross-linking

- 'click' reaction as potential carriers for drug administration. *Carbohydrate Polymers*, 183, 278-286. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.034>
- Guaresti, O., García-Astrain, C., Palomares, T., Alonso-Varona, A., Eceiza, A., & Gabilondo, N. (2017). Synthesis and characterization of a biocompatible chitosan-based hydrogel cross-linked via «click» chemistry for controlled drug release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.003>
- Gullapalli, R. P., & Mazzitelli, C. L. (2015). Polyethylene glycols in oral and parenteral formulations—A critical review. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 219-239. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.015>
- Hager, M. D., & Zechel, S. (2020). Chapter 3 - Self-healing polymers: From general basics to mechanistic aspects. En S. Thomas & A. Surendran (Eds.), *Self-Healing Polymer-Based Systems* (pp. 75-94). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818450-9.00003-9>
- Hassan, M. M. (2018). Enhanced antimicrobial activity and reduced water absorption of chitosan films graft copolymerized with poly(acryloyloxy)ethyltrimethylammonium chloride. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1685-1695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.013>
- Herndon, W. C., Grayson, C. R., & Manion, J. M. (1967). Retro-Diels-Alder reactions. III. Kinetics of the thermal decompositions of exo- and endo-dicyclopentadiene. *The Journal of Organic Chemistry*, 32(3), 526-529. <https://doi.org/10.1021/jo01278a003>
- Holly, E. E., Venkataraman, S. K., Chambon, F., & Henning Winter, H. (1988). Fourier transform mechanical spectroscopy of viscoelastic materials with transient structure. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 27(1), 17-26. [https://doi.org/10.1016/0377-0257\(88\)80002-8](https://doi.org/10.1016/0377-0257(88)80002-8)
- Huisgen, R. (1984). 1,3-Dipolar cycloaddition – Introduction, survey, mechanism. En A. Padwa (Ed.), *1,3-dipolar cycloaddition chemistry* (Vol. 1, pp. 1-176). John Wiley and Sons.
- Inoue, K., Yamashiro, M., & Iji, M. (2009). Recyclable shape-memory polymer: Poly(lactic acid) crosslinked by a thermoreversible Diels–Alder reaction. *Journal of Applied Polymer Science*, 112(2), 876-885. <https://doi.org/10.1002/app.29469>
- Islam, Md. M., Shahruzzaman, Md., Biswas, S., Nurus Sakib, Md., & Rashid, T. U. (2020). Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. *Bioactive Materials*, 5(1), 164-183. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
- Jasiński, R. (2016a). First example of stepwise, zwitterionic mechanism for bicyclo[2.2.1]hept-5-ene (norbornene) formation process catalyzed by the 1-butyl-3-methylimidazolium cations. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*, 147(7), 1207-1213. <https://doi.org/10.1007/s00706-016-1735-5>
- Jasiński, R. (2016b). A reexamination of the molecular mechanism of the Diels–Alder reaction between tetrafluoroethene and cyclopentadiene. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 119(1), 49-57. <https://doi.org/10.1007/s11144-016-1038-1>
- Jasiński, R. (2017). One-step versus two-step mechanism of Diels-Alder reaction of 1-chloro-1-nitroethene with cyclopentadiene and furan. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 75, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.04.008>
- Jean, M., Smaoui, F., Lavertu, M., Méthot, S., Bouhdoud, L., Buschmann, M. D., & Merzouki, A.

- (2009). Chitosan–plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Therapy*, 16(9), 1097-1110. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.60>
- Jing, Z.-W., Ma, Z.-W., Li, C., Jia, Y.-Y., Luo, M., Ma, X.-X., Zhou, S.-Y., & Zhang, B.-L. (2017). Chitosan cross-linked with poly(ethylene glycol)dialdehyde via reductive amination as effective controlled release carriers for oral protein drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(4), 1003-1006. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.072>
- Jung, S., Liu, J. T., Hong, S. H., Arunbabu, D., Noh, S. M., & Oh, J. K. (2017). A new reactive polymethacrylate bearing pendant furfuryl groups: Synthesis, thermoreversible reactions, and self-healing. *Polymer*, 109, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.12.029>
- Jung, S., & Oh, J. K. (2017). Well-defined methacrylate copolymer having reactive maleimide pendants for fabrication of thermally-labile crosslinked networks with robust self-healing. *Materials Today Communications*, 13, 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2017.09.008>
- Jurczak, J., Kawczynski, A. L., & Kozluk, T. (1985). Stability of cycloadducts obtained by high-pressure Diels-Alder reaction between 3,4-dimethoxyfuran and 1,4-benzoquinones: Kinetic studies of retro-Diels-Alder reaction. *The Journal of Organic Chemistry*, 50(7), 1106-1107. <https://doi.org/10.1021/jo00207a035>
- Kim, I.-Y., Seo, S.-J., Moon, H.-S., Yoo, M.-K., Park, I.-Y., Kim, B.-C., & Cho, C.-S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26(1), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.009>
- Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11), 2004-2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5)
- Kong, S., & Evanseck, J. D. (2000). Density Functional Theory Study of Aqueous-Phase Rate Acceleration and Endo/Exo Selectivity of the Butadiene and Acrolein Diels–Alder Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 122(42), 10418-10427. <https://doi.org/10.1021/ja0010249>
- Koosehghol, S., Ebrahimian-Hosseiniabadi, M., Alizadeh, M., & Zamanian, A. (2017). Preparation and characterization of in situ chitosan/polyethylene glycol fumarate/thymol hydrogel as an effective wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, 79, 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.001>
- Kritchenkov, A. S., & Skorik, Y. A. (2017). Click reactions in chitosan chemistry. *Russian Chemical Bulletin*, 66(5), 769-781. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1809-5>
- Kumari, S., Rath, P., Sri Hari Kumar, A., & Tiwari, T. N. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation*, 3, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.01.002>
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2010). Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567-1636. <https://doi.org/10.3390/md8051567>
- Kurita, K., Ikeda, H., Yoshida, Y., Shimojoh, M., & Harata, M. (2002). Chemoselective Protection

- of the Amino Groups of Chitosan by Controlled Phthaloylation: Facile Preparation of a Precursor Useful for Chemical Modifications. *Biomacromolecules*, 3(1), 1-4. <https://doi.org/10.1021/bm0101163>
- Kurita, K., Kaji, Y., Mori, T., & Nishiyama, Y. (2000). Enzymatic degradation of β -chitin: Susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 42(1), 19-21. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00127-7)
- Kurita, Y., & Isogai, A. (2010). Reductive N-alkylation of chitosan with acetone and levulinic acid in aqueous media. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(2), 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.05.001>
- Kurita, Y., & Isogai, A. (2012). N-Alkylations of chitosan promoted with sodium hydrogen carbonate under aqueous conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 741-746. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.004>
- Li, J., Chen, L., Meng, Z., & Dou, G. (2019). Development of a mass spectrometry method for the characterization of a series of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.194>
- Li, S., Wang, L., Yu, X., Wang, C., & Wang, Z. (2018). Synthesis and characterization of a novel double cross-linked hydrogel based on Diels-Alder click reaction and coordination bonding. *Materials Science and Engineering: C*, 82, 299-309. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.031>
- Liu, X., Du, P., Liu, L., Zheng, Z., Wang, X., Joncheray, T., & Zhang, Y. (2013). Kinetic study of Diels–Alder reaction involving in maleimide–furan compounds and linear polyurethane. *Polymer Bulletin*, 70(8), 2319-2335. <https://doi.org/10.1007/s00289-013-0954-8>
- Lizardi-Mendoza, J., Argüelles Monal, W. M., & Goycoolea Valencia, F. M. (2016). Chapter 1—Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. En S. Bautista-Baños, G. Romanazzi, & A. Jiménez-Aparicio (Eds.), *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* (pp. 3-31). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00001-X>
- Lu, C., Jiang, L., Xu, W., Yu, F., Xia, W., Pan, M., Zhou, W., Pan, X., Wu, C., & Liu, D. (2019). Poly(ethylene glycol) crosslinked multi-armed poly(ϵ -benzyloxycarbonyl-L-lysine)s as super-amphiphiles: Synthesis, self-assembly, and evaluation as efficient delivery systems for poorly water-soluble drugs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 182, 110384. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110384>
- Mehrabi, M., Dounighi, N. M., Rezayat Sorkhabadi, S. M., Doroud, D., Amani, A., Khoobi, M., Ajdary, S., & Pilehvar-Soltanahmadi, Y. (2018). Development and physicochemical, toxicity and immunogenicity assessments of recombinant hepatitis B surface antigen (rHBsAg) entrapped in chitosan and mannosylated chitosan nanoparticles: As a novel vaccine delivery system and adjuvant. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 230-240. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1417868>
- Mirtajaddini, S. A., Fathi Najafi, M., Vaziri Yazdi, S. A., & Kazemi Oskuee, R. (2021). Preparation of Chitosan Nanoparticles as a Capable Carrier for Antigen Delivery and Antibody Production. *Iranian Journal of Biotechnology*, 19(4), e2871. <https://doi.org/10.30498/ijb.2021.247747.2871>

- Mocini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M., & Gomez d'Ayala, G. (2020). Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*, 233, 115839. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>
- Montiel-Herrera, M., Gandini, A., Goycoolea, F. M., Jacobsen, N. E., Lizardi-Mendoza, J., Recillas-Mota, M., & Argüelles-Monal, W. M. (2015a). N-(furfural) chitosan hydrogels based on Diels–Alder cycloadditions and application as microspheres for controlled drug release. *Carbohydrate Polymers*, 128, 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.052>
- Montiel-Herrera, M., Gandini, A., Goycoolea, F. M., Jacobsen, N. E., Lizardi-Mendoza, J., Recillas-Mota, M. T., & Argüelles-Monal, W. M. (2015b). Furan–chitosan hydrogels based on click chemistry. *Iranian Polymer Journal*, 24(5), 349-357. <https://doi.org/10.1007/s13726-015-0325-4>
- Muzzarelli, R. A. A. (1993). Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. *Carbohydrate Polymers*, 20(1), 7-16. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(93\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0144-8617(93)90027-2)
- Nemtsev, S. V., Gamzazade, A. I., Rogozhin, S. V., Bykova, V. M., & Bykov, V. P. (2002). Deacetylation of Chitin under Homogeneous Conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6), 521-526. <https://doi.org/10.1023/A:1020766325395>
- Oluwasanmi, A., & Hoskins, C. (2021). Potential use of the Diels-Alder reaction in biomedical and nanomedicine applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 604, 120727. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120727>
- Orozco, F., Li, J., Ezekiel, U., Niyazov, Z., Floyd, L., Lima, G. M. R., Winkelman, J. G. M., Moreno-Villoslada, I., Picchioni, F., & Bose, R. K. (2020). Diels-Alder-based thermoreversibly crosslinked polymers: Interplay of crosslinking density, network mobility, kinetics and stereoisomerism. *European Polymer Journal*, 135, 109882. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109882>
- Ouchi, T., Nishizawa, H., & Ohya, Y. (1998). Aggregation phenomenon of PEG-grafted chitosan in aqueous solution. *Polymer*, 39(21), 5171-5175. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)10020-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)10020-9)
- Pakizeh, M., Moradi, A., & Ghassemi, T. (2021). Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells. *European Polymer Journal*, 159, 110709. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110709>
- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., & Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 27-46. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00090-4)
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641-678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- Polgar, L. M., Kingma, A., Roelfs, M., van Essen, M., van Duin, M., & Picchioni, F. (2017). Kinetics of cross-linking and de-cross-linking of EPM rubber with thermoreversible Diels-Alder chemistry. *European Polymer Journal*, 90, 150-161.

<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.03.020>

- Pramanik, N. B., Mondal, P., Mukherjee, R., & Singha, N. K. (2017). A new class of self-healable hydrophobic materials based on ABA triblock copolymer via RAFT polymerization and Diels-Alder “click chemistry”. *Polymer*, *119*, 195-205. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.05.003>
- Rulísek, L., Sebek, P., Havlas, Z., Hrabal, R., Capek, P., & Svatos, A. (2005). An experimental and theoretical study of stereoselectivity of furan-maleic anhydride and furan-maleimide diels-alder reactions. *The Journal of Organic Chemistry*, *70*(16), 6295-6302. <https://doi.org/10.1021/jo050759z>
- Savin, C.-L., Popa, M., Delaite, C., Costuleanu, M., Costin, D., & Peptu, C. A. (2019). Chitosan grafted-poly(ethylene glycol) methacrylate nanoparticles as carrier for controlled release of bevacizumab. *Materials Science and Engineering: C*, *98*, 843-860. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.036>
- Sedaghat, F., Yousefzadi, M., Toiserkani, H., & Najafipour, S. (2017). Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 883-888. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.099>
- Shevchenko, R. V., James, S. L., & James, S. E. (2010). A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of the Royal Society Interface*, *7*(43), 229-258. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0403>
- Srinivasan, H., Kanayairam, V., & Ravichandran, R. (2018). Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 662-667. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.035>
- Stockmayer, W. H. (1943). Theory of Molecular Size Distribution and Gel Formation in Branched-Chain Polymers. *The Journal of Chemical Physics*, *11*(2), 45-55. <https://doi.org/10.1063/1.1723803>
- Sun, Y., Nan, D., Jin, H., & Qu, X. (2020). Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Polymer Testing*, *81*, 106283. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106283>
- Sustainable biomaterials based on cellulose, chitin and chitosan composites—A review | Elsevier Enhanced Reader.* (s. f.). <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100079>
- Tabriz, A., Ur Rehman Alvi, M. A., Khan Niazi, M. B., Batool, M., Bhatti, M. F., Khan, A. L., Khan, A. U., Jamil, T., & Ahmad, N. M. (2019). Quaternized trimethyl functionalized chitosan based antifungal membranes for drinking water treatment. *Carbohydrate Polymers*, *207*, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.066>
- Tanuma, H., Saito, T., Nishikawa, K., Dong, T., Yazawa, K., & Inoue, Y. (2010). Preparation and characterization of PEG-cross-linked chitosan hydrogel films with controllable swelling and enzymatic degradation behavior. *Carbohydrate Polymers*, *80*(1), 260-265. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.022>
- Tao, F., Cheng, Y., Shi, X., Zheng, H., Du, Y., Xiang, W., & Deng, H. (2020). Applications of

- chitin and chitosan nanofibers in bone regenerative engineering. *Carbohydrate Polymers*, 230, 115658. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115658>
- Tasdelen, M. A., Kiskan, B., & Yagci, Y. (2016). Externally stimulated click reactions for macromolecular syntheses. *Progress in Polymer Science*, 52, 19-78. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.09.003>
- The Nobel Prize in Chemistry*. (1950). [Nobel Media AB]. NobelPrize.Org. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1950/summary/>
- Tietze, L. F., & Ketschau, G. (1997). Hetero Diels-Alder reactions in organic chemistry. En *Stereoselective Heterocyclic Synthesis I* (pp. 1-120). Springer.
- Tung, C.-Y. M., & Dynes, P. J. (1982). Relationship between viscoelastic properties and gelation in thermosetting systems. *Journal of Applied Polymer Science*, 27(2), 569-574. <https://doi.org/10.1002/app.1982.070270220>
- Urdl, K., Weiss, S., Karpa, A., Perić, M., Zikulnig-Rusch, E., Brecht, M., Kandelbauer, A., Müller, U., & Kern, W. (2018). Furan-functionalised melamine-formaldehyde particles performing Diels-Alder reactions. *European Polymer Journal*, 108, 225-234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.08.023>
- Winter, H. H. (2002). The Critical Gel. *Structure and Dynamics of Polymer and Colloidal Systems*, 439-470. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0442-8_14
- Winter, H., & Mours, M. (1997). *Rheology of Polymers Near Liquid-Solid Transitions*. https://doi.org/10.1007/3-540-68449-2_3
- Wool, R. P. (2008). Self-healing materials: A review. *Soft Matter*, 4(3), 400-418. <https://doi.org/10.1039/B711716G>
- Wool, R. P., & O'Connor, K. M. (1981). A theory crack healing in polymers. *Journal of Applied Physics*, 52(10), 5953-5963. <https://doi.org/10.1063/1.328526>
- Xiao, X.-F., Jiang, X.-Q., & Zhou, L.-J. (2013). Surface Modification of Poly Ethylene Glycol to Resist Nonspecific Adsorption of Proteins. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 41(3), 445-453. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60638-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60638-6)
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133-1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
- Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029>
- Zhang, F., Ju, P., Pan, M., Zhang, D., Huang, Y., Li, G., & Li, X. (2018). Self-healing mechanisms in smart protective coatings: A review. *Corrosion Science*, 144, 74-88. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2018.08.005>
- Zhang, H., Yun, S., Song, L., Zhang, Y., & Zhao, Y. (2017). The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 334-339. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.017>

- Zhang, Z. P., Rong, M. Z., & Zhang, M. Q. (2018). Polymer engineering based on reversible covalent chemistry: A promising innovative pathway towards new materials and new functionalities. *Progress in Polymer Science*, 80, 39-93. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.03.002>
- Zhu, S., Li, S., Escuin-Ordinas, H., Dimatteo, R., Xi, W., Ribas, A., & Segura, T. (2018). Accelerated wound healing by injectable star poly(ethylene glycol)-b-poly(propylene sulfide) scaffolds loaded with poorly water-soluble drugs. *Journal of Controlled Release*, 282, 156-165. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.006>